

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

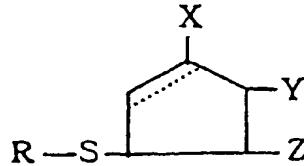
世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07C 323/50, 323/17, 323/22, A61K 31/10, 31/12, 31/195	A1	(11) 国際公開番号 WO98/39291 (43) 国際公開日 1998年9月11日(11.09.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00815		
(22) 国際出願日 1998年2月26日(26.02.98)		
(30) 優先権データ 特願平9/65616 特願平9/124696 特願平9/172786 特願平9/172782 特願平9/225533 特願平9/241680 特願平9/283204 特願平9/362273 特願平9/363281	1997年3月5日(05.03.97) 1997年4月30日(30.04.97) 1997年6月16日(16.06.97) 1997年6月16日(16.06.97) 1997年8月8日(08.08.97) 1997年8月25日(25.08.97) 1997年10月1日(01.10.97) 1997年12月12日(12.12.97) 1997年12月16日(16.12.97)	JP JP JP JP JP JP JP JP JP
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)		西山英治(NISHIYAMA, Eiji)[JP/JP] 萩屋道雄(HAGIYA, Michio)[JP/JP] 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)[JP/JP] 蝶野英人(CHONO, Hideto)[JP/JP] 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP] 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 小山信人(KOYAMA, Nobuto)[JP/JP] 榎 竜嗣(ENOKI, Tatsushi)[JP/JP] 猪飼勝重(IKAI, Katsuhige)[JP/JP] 務 華康(WU, Hua-Kang)[CA/JP] 大野木宏(OHNOGI, Hiromu)[JP/JP] 富永隆生(TOMINAGA, Takanari)[JP/JP]		(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)
		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ヨ ーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
		添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: COMPOUNDS

(54) 発明の名称 化合物



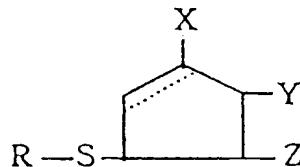
[I]

(57) Abstract

Compounds represented by general formula (I), optically active isomers thereof, or salts of either, wherein the bond indicated by the dotted line in the five-membered ring means that the five-membered ring is either an unsaturated cyclopentene ring or a saturated cyclopentane ring, provided when it is a cyclopentene ring, then X is OH, Y is =O, and Z is H, while when it is a cyclopentane ring, then X is =O, Y is OH, and Z is OH; and R is the residue formed from a compound having an SH group by removing the SH group.

(57) 要約

下記一般式【I】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩。



【I】

(式中、5員環内の点線で示した結合子は、当該5員環が、二重結合を有するシクロペンテン環、或いはそれが飽和されたシクロペンタン環のいずれでもよいことを意味する。そして、シクロペンテン環の場合、XはOH、Yは=O、ZはHであり、他方シクロペンタン環の場合、Xは=O、YはOH、ZはOHである。またRはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スウェーデン
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TG	チエコ
AU	オーストラリア	GB	英國	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TM	トルクメニスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TT	トリニダッド・トバゴ
BEE	ベルギー	GN	ギニア・ビサオ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BFG	ブルガリア	GW	ギリシャ	MR	モンゴル	UZ	ウガンダ
BG	ブルガリア	GR	ハンガリー	MW	マラウイ	VN	米国
BJ	ベナン	HU	インドネシア	MX	メキシコ	VS	ベキスタン
BR	ブラジル	ID	アイルランド	NE	エジプト	WT	ヴィエトナム
BYA	ベラルーシ	IE	イスラエル	NL	オランダ	YU	ヨーロッパ
CFA	カナダ	IL	アイスラーン	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CCF	中央アフリカ	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CGH	コンゴ共和国	JP	日本	PL	ポーランド		
CH	スイス	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CI	コートジボアール	KP	キルギス	RO	ローマニア		
CM	カメルーン	KR	北朝鮮	RU	ロシア		
CN	中国	KZ	カザフスタン	SD	スード		
CL	キューバ	LC	セント・ルシア	SE	セントルシア		
CY	キプロス	LK	シリビティンシティ	SG	シンガポール		
CZ	չչչչ	LR	スリベリア	SI	スロヴェニア		
DEK	ドイツ	LS	レソト	SK	スロ伐キア		
EE	エストニア			SL	シエラ・レオネ		
ES	スペイン						

明 細 書
化合物

発明の属する技術分野

本発明は、医薬の分野で有用な、制がん作用等の生理活性を有する化合物に関し、更に当該化合物の製造方法に関する。

従来の技術

従来、臨床上の療法に用いられている薬物はアルキル化剤、代謝阻害剤、植物アルカロイド等の制がん剤、抗生物質、免疫促進剤、免疫調節剤など多岐にわたっているが、これらの薬物療法はいまだ完成したとはいがたい。

これらのうち、天然物由来であるプロスタグラランジンの中で、5員環に α 、 β -不飽和カルボニルを有するプロスタグラランジンA及びJ類がDNA合成を抑制することにより、安全性の高い制がん剤としての可能性が報告され、それらの各種誘導体が合成されている（特開昭62-96438号公報参照）。

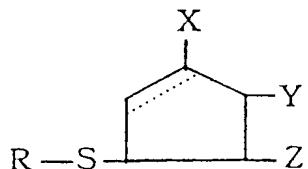
発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、制がん作用等の生理作用を有する化合物を開発し、該化合物の製造方法及び当該化合物を含有する医薬を提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明者らはかかる目的を達成するために鋭意検討した結果、一般式【I】で表される化合物（以下、単に本発明の化合物と称す）が、式【IV】で表される4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン（以下、単にシクロペンテノンと称す）と、SH基含有化合物との反応により生成し、この本発明の化合物が種々の強い生理活性を有し、該化合物に感受性を示す疾患の治療及び／又は予防に有用であることを見出し、本発明を完成した。

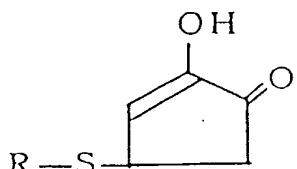
本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、下記一般式【I】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩に関する。



[I]

(式中、5員環内の点線で示した結合子は、当該5員環が、二重結合を有するシクロペンテン環、或いはそれが飽和されたシクロペンタン環のいずれでもよいことを意味する。そして、シクロペンテン環の場合、XはOH、Yは=O、ZはHであり、他方シクロペンタン環の場合、Xは=O、YはOH、ZはOHである。またRはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

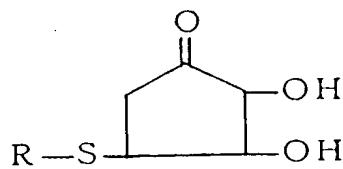
本発明の第1の発明の態様としては、下記一般式【II】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩がある。



[11]

(但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

本発明の第1の発明の別の態様としては、下記一般式【III】で表される化合物
若しくはその光学活性体又はそれらの塩がある。

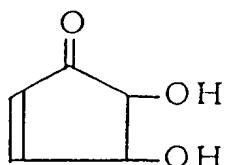


[III]

(但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

本発明の第2の発明は、下記式【IV】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択され

る化合物と、SH基含有化合物を反応させることを特徴とする本発明の第1の発明の一般式【I】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の製造方法に関する。



【IV】

本発明の第1、2の発明の好ましい態様では、SH基含有化合物はSH基含有アミノ酸又はその誘導体である。

本発明の第3の発明は本発明の第1の発明の一般式【I】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として含有することを特徴とする医薬に関する。

本発明の第3の発明の好ましい態様では、前記医薬は生体防御剤（例えば免疫調節剤、抗アレルギー剤、抗リウマチ剤）、糖尿病治療剤、制がん剤、アポトーシス誘発剤、又は抗病原微生物剤（例えば抗ウイルス剤、抗菌剤）である。

図面の簡単な説明

図1はCM1のマスクスペクトルを示す図である。

図2はCM1の¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図3はCM1のUV吸収スペクトルを示す図である。

図4はCM2の¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図5はCM1の¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図6はCMのIR吸収スペクトルを示す図である。

図7は保持時間と吸光度の関係を示す図である。

図8はGMの¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図9はGMの¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図10はGMのマススペクトルを示す図である。

図11はGMのUV吸収スペクトルを示す図である。

図12はGMのIR吸収スペクトルを示す図である。

図13はシクロペンタノンチオ誘導体の1例の溶出パターンを示す図である。

図14はレーシステインを用いた場合の反応時間と215nmにおける吸光度の関係を示す図である。

図15はグルタチオンを用いた場合の反応時間と215nmにおける吸光度の関係を示す図である。

図16は本発明の1例の反応物のクロマトグラムを示す図である。

図17は図4の2.99分のピークの質量スペクトルを示す図である。

図18は溶解直後の反応液の紫外吸収スペクトルを示す図である。

図19は50分間反応後の反応液の紫外吸収スペクトルを示す図である。

図20はグルタチオンを用いた場合の溶解直後の反応液の紫外吸収スペクトルを示す図である。

図21はグルタチオンを用いた場合の50分間反応後の反応液の紫外吸収スペクトルを示す図である。

図22は反応物の¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図23は保持時間と吸光度の関係を示す図である。

図24はGDの¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図25はGDの¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図26はGDのマススペクトルを示す図である。

図27はGDのIR吸収スペクトルを示す図である。

図28はCMのがん細胞増殖抑制活性を示す図である。

図29はCMのがん細胞増殖抑制活性を示す図である。

図30はGM量と腫瘍壞死因子産生量の関係を示す図である。

図31はGM量と足浮腫増加率の関係を示す図である。

図32は培養液中のGM濃度とNO₂⁻濃度の関係を示す図である。

図33は培養時間と生細胞数の関係を示す図である。

図34はJurkat細胞の増殖に対するGMの影響を示す図である。

図35はMolt-3細胞の増殖に対するGMの影響を示す図である。

図36はM o l t - 3細胞におけるファス抗原の発現を示す図である。

図37はJ u r k a t細胞におけるファス抗原の発現を示す図である。

図38はファス抗原発現細胞の比率の変化を示す図である。

図39はGM投与量と血糖値の関係を示す図である。

図40はGM投与量と血清インスリン値の関係を示す図である。

図41はGM投与量と血清総コレステロール値の関係を示す図である。

図42はGM投与量と血清トリグリセリド値の関係を示す図である。

図43はGM投与量と血清遊離脂肪酸値の関係を示す図である。

図44はGM濃度と細胞生存率の関係を示す図である。

図45はGM濃度とp24生産量の関係を示す図である。

図46はGMの遅延型過敏反応抑制作用を示す図である。

図47は(-)体シクロペンテノンのp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(-)体シクロペンテノンの立体構造を示す図である。

図48は(+)体シクロペンテノンのp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(+)体シクロペンテノンの立体構造を示す図である。

発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明において使用する式【IV】で表されるシクロペンテノンは、4位と5位のヒドロキシル基の立体配置がシスの異性体とトランスの異性体の双方を包含する。本発明においてはシス体シクロペンテノンを用いてもよいし、トランス体シクロペンテノンを用いてもよいし、シス体シクロペンテノンとトランス体シクロペンテノンの混合物を用いてもよい。また、これらの光学活性体を用いてもよい。

シス体シクロペンテノンは化学合成法によって得られる〔ヘルベチカ・キミカ・アクタ (Helvetica Chimica Acta)、第55巻、第2838～2844頁(1972)〕。トランス体シクロペンテノンは化学合成法によっても得られるし〔カーボハイドレート・リサーチ (Carbohydrate Res.)、第247巻、第217～222頁(1993)〕、またウロ

ン酸、例えばグルクロン酸、ウロン酸誘導体、例えばグルクロノラクトン、又はこれらの含有物等を加熱処理することによっても得られる（PCT/JP97/03052号明細書参照）。本発明ではシクロペンテノンを含有するこれらの加熱処理物、その部分精製物及び精製物も使用できる。

例えば、ウロン酸としてD-グルクロン酸を使用し、その1%溶液を121°Cで4時間加熱処理することにより、加熱処理物中にシクロペンテノンが生成される。この加熱処理物中のシクロペンテノンを溶媒で抽出し、抽出物を濃縮する。次にこの濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、溶出するシクロペンテノン画分を濃縮し、濃縮物からシクロペンテノンをクロロホルムで抽出し、抽出濃縮物の順相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、加熱処理物中のシクロペンテノンが単離される。

シクロペンテノンの物性を下記に示す。なおシクロペンテノンの質量分析はDX302質量分析計（日本電子社製）を用いて行った。また、重クロロホルム溶媒を用いたNMRスペクトルの測定はJNM-A500（日本電子社製）を用いた。比旋光度はDIP-370型旋光計（日本分光社製）、UV吸収スペクトルはUV-2500分光光度計（島津製作所社製）、赤外吸収スペクトル（IR）はFTIR-8000赤外分光光度計（島津製作所社製）をそれぞれ用い測定した。

MS m/z 115 [M+H]⁺

¹H-NMR (CDCl₃)

δ 4.20 (1H, d, J = 2.4Hz, 5-H)、4.83 (1H, m, 4-H)、6.30 (1H, dd, J = 1.2, 6.1Hz, 2-H)、7.48 (1H, dd, J = 2.1, 6.1Hz, 3-H)

但し、¹H-NMRの化学シフト値はCHCl₃の化学シフト値を7.26 ppmとして表した。

旋光度：[α]_D²⁰ 0° (c 1, 3、水)

UV: λ_{max} 215nm (水)

IR (KBr法) : 3400、1715、1630、1115、1060、1

0 2 5 cm⁻¹に吸収を有する。

単離されたシクロペンテノンを光学分割することにより、(−)−4, 5−ジヒドロキシ−2−シクロペンテン−1−オン及び(+)−4, 5−ジヒドロキシ−2−シクロペンテン−1−オンを得ることができる。当然、合成方法により得られたシクロペンテノンも光学分割することができる。

例えば、シクロペンテノンをエタノールに溶かす。このエタノール溶液にヘキサン/エタノール(94/6)を更に加え、シクロペンテノン溶液を調製する。この試料溶液を、例えばキラールパック AS(ダイセル化学工業)カラムを用いカラム温度：40°C、移動相：ヘキサン/エタノール(94/6)でHPLCを行うことにより、シクロペンテノンを光学分割することができる。

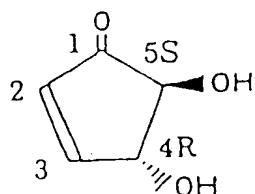
分割された(−)−トランス−4, 5−ジヒドロキシ−2−シクロペンテン−1−オン[以下、(−)体シクロペンテノンと称する]の旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} - 105^{\circ}$ (c 0.30、エタノール)であり、(+)−トランス−4, 5−ジヒドロキシ−2−シクロペンテン−1−オン[以下、(+)体シクロペンテノンと称する]の旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} + 104^{\circ}$ (c 0.53、エタノール)である。なお旋光度は前記のDIP−370型旋光計(日本分光社製)を用いて測定した。

次に(−)体シクロペンテノン及び(+)体シクロペンテノンのそれぞれの質量分析、核磁気共鳴法(NMR)による構造解析、UV吸収スペクトルの測定、赤外吸収スペクトルの測定を上記記載の方法に準じ行う。その結果、両光学活性体は光学分割前のシクロペンテノンと同一の結果を示す。

光学分割された(−)体シクロペンテノン及び(+)体シクロペンテノンをそれぞれp−ジメチルアミノベンゾイル誘導体とし、J−720型円二色性分散計(日本分光社製)を用い、円二色性スペクトル(CD)を測定し、その結果をジベンゾエートキラリティルールに適用し[J. Am. Chem. Soc., 第91巻、第3989～3991頁(1969)]、その立体配置を決定した。

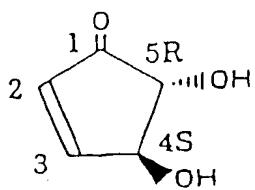
(−)体シクロペンテノンのp−ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(−)体シクロペンテノンの立体構造を図47に示す。図中縦軸はモル円二色性

、横軸は波長 (nm) を示す。なお、上記立体構造を、式【V】として下記に示す：



【V】

(+) 体シクロペンテノンの p-ジメチルアミノベンゾイル誘導体の CD 及び
 (+) 体シクロペンテノンの立体構造を図 4.8 に示す。図中縦軸はモル円二色性
 、横軸は波長 (nm) を示す。なお、上記立体構造を、式【VI】として下記に示す：



【VI】

図 4.7、4.8 及び式【V】、式【VI】に示すように (-) 体シクロペンテノンは (-) - (4R, 5S) - トランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテノン-1-オン、(+)-体シクロペンテノンは (+) - (4S, 5R) - トランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテノン-1-オンである。

以上、本発明に使用するシクロペンテノン又はその光学活性体はいかなる方法で製造しても良く、明細書で開示の方法で製造しても良く、化学合成方法で合成しても良く、シクロペンテノンのトランス体、シス体、それらの混合物及びそれらの光学活性体も本発明に使用される。

シクロペンテノン又はその光学活性体の塩としては、医薬として許容される塩があり、公知の方法にて変換することができる。

シクロペンテノン、その光学活性体及び／又はそれらの塩と、SH基含有化合物とを反応させることにより、反応液中に本発明の一般式【I】で表される化合物が生成する。

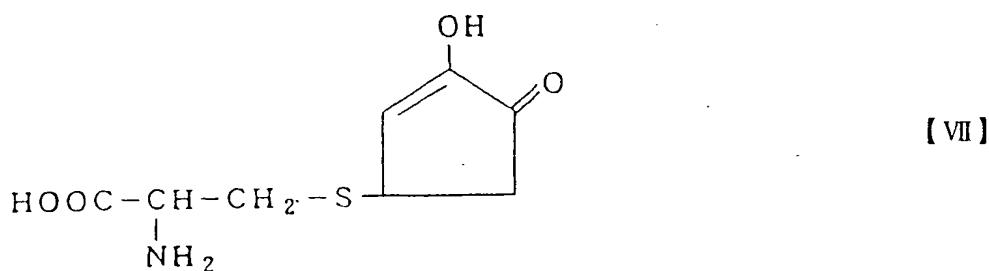
また、シクロペンテノン、その光学活性体及び／又はそれらの塩と、SH基含有化合物、例えばSH基含有アミノ酸又はその誘導体とを酸性下で反応させることにより、反応液中に一般式【II】で表される化合物（以下、シクロペンテノンチオ誘導体と称す）が生成する。

SH基含有化合物は何ら限定ではなく、例としてはメタンチオール、ブタンチオール、メルカプトエタノール、SH基含有アミノ酸、SH基含有アミノ酸誘導体等が挙げられる。SH基含有アミノ酸の例としては、システイン、ホモシステイン等が挙げられる。

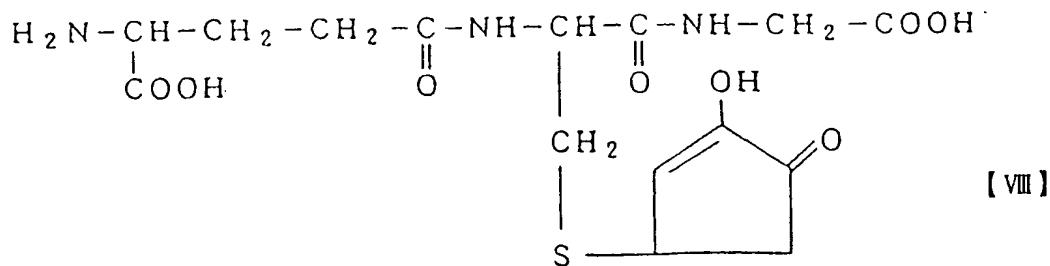
SH基含有アミノ酸誘導体としては、上記アミノ酸の誘導体、例えばシステイン誘導体、システイン含有ペプチド、システイン誘導体含有ペプチドが例示される。システイン含有ペプチドとしてはペプチド中にシステインが構成成分となつていれば良く、特に限定はない。本発明のシステイン含有ペプチドとしては、オリゴペプチド、例えばグルタチオンのような低分子物からタンパク質のような高分子物までを包含する。またシスチン又はホモシスチンを含有するペプチドも反応中にシステイン又はホモシステイン含有ペプチドとなる条件下、例えば還元処理を組合せることにより、本発明のシステイン又はホモシステイン含有ペプチドとして使用することができる。なおシステイン含有ペプチドとしては、糖質、脂質等を含有するシステイン含有ペプチドも包含される。また、上記した各種の物の塩、酸無水物、エステル等であってもよい。以上、シクロペンテノンはSH基含有化合物と酸性下で反応し、シクロペンテノンチオ誘導体が形成される。

シクロペンテノン、その光学活性体及び／又はそれらの塩と、SH基含有化合物、例えばSH基含有アミノ酸、又はその誘導体とが反応し、生成したシクロペンテノンチオ誘導体又はその光学活性体の精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラ

フィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、反応生成物中のシクロペンテノンチオ誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩を精製、単離することができる。例えばシクロペンテノンとシステインを pH 4、60°Cで 16 時間反応させることにより、反応液中に下記式【VII】で表されるシクロペンテノンチオ誘導体が生成し、この誘導体を含有する反応生成物の順相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、シクロペンテノンチオ誘導体を精製、単離することができる。



また例えばシクロペンテノンとグルタチオンを酸性下で反応させることにより、反応液中に下記式【VIII】で表されるシクロペンテノンチオ誘導体が生成し、この誘導体を含有する反応生成物の逆相カラムクロマトグラフィー等を行うことにより、該シクロペンテノンチオ誘導体を精製、単離することができる。

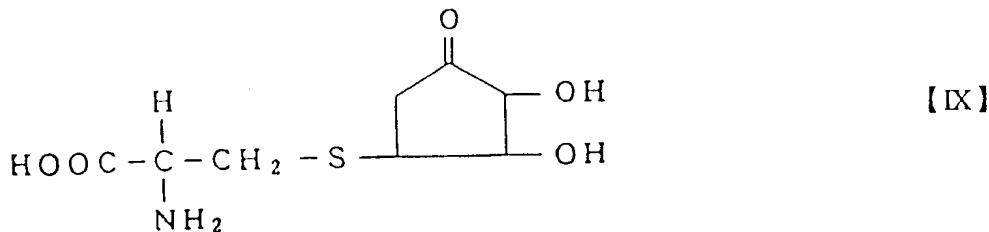


シクロペンテノン、その光学活性体及び／又はそれらの塩と、SH 基含有化合物、例えば SH 基含有アミノ酸又はその誘導体とを中性で反応させることにより、反応液中に一般式【III】で表される化合物（以下、シクロペンタノンチオ誘導体と称す）が生成する。

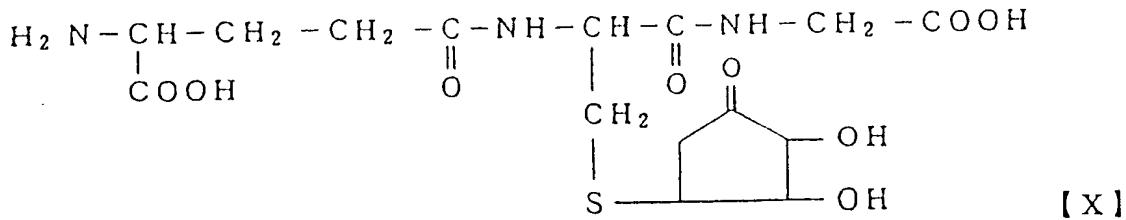
上記SH基含有化合物は何ら限定はなく、前記のSH基含有化合物が挙げられる。シクロペンテノン、その光学活性体及び／又はそれらの塩と、SH基含有化合物との上記の反応はpH中性で行うのが良い。

シクロペンテノン、その光学活性体及び／又はそれらの塩と、SH基含有化合物とが反応し、生成したシクロペンタノンチオ誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩の精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、反応生成物中のシクロペンタノンチオ誘導体若しくはその光学活性体又はそれらの塩を精製、単離することができる。

例えばシクロペンテノンとシステインをpH7、37°Cで30分間反応させることにより、反応液中に下記式【IX】で表されるシクロペンタノンチオ誘導体が生成し、この誘導体を含有する反応生成物の逆相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、シクロペンタノンチオ誘導体を精製、単離することができる。



また例えばシクロペンテノンとグルタチオンを中性下で反応させることにより、反応液中に下記式【X】で表されるシクロペンタノンチオ誘導体が生成し、この誘導体を含有する反応生成物の逆相カラムクロマトグラフィー等を行うことにより、該シクロペンタノンチオ誘導体を精製し、単離することができる。



本発明の化合物の光学活性体の分離はラセミ混合物の機械的分割、優先晶出法、ジアステレオマー塩あるいは包接化合物としての結晶化による分割、酵素・微生物による動力学的分割、クロマトグラフィーによる分割等により行うことができる。

クロマトグラフィーによる分離としては、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等を用いることができ、それぞれに適したキラル固定相を使用すればよい。

液体クロマトグラフィーによる光学分割としては、キラルな固定相を用いる方法、キラルな溶離液を用いる方法、ジアステレオマーとしての分離等を用いることができる。

キラル固定相としてはアミド系固定相、尿素系固定相、配位子交換型固定相、多糖・多糖誘導体固定相、タンパク質固定相、ポリメタクリル酸エステル固定相、ポリメタクリルアミド固定相等が使用できる。

溶離液としてはヘキサン系、アルコール系、水（緩衝液）系等が使用でき、上記固定相との組合せにおいて適宜使用することができる。

本発明の化合物又はその光学活性体の塩としては、医薬として許容される塩があり、公知の方法にて変換することができる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は制がん活性、がん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性、トポイソメラーゼII阻害活性、がん細胞分化誘導活性、抗リウマチ活性、慢性関節リウマチ抑制作用、ファス抗原産生誘導活性、抗菌活性、抗ウイルス活性、肝機能改善活性、熱ショックタンパク誘

導活性、血液成分正常化活性、がん免疫増強活性、抗炎症活性、腫瘍壊死因子産生抑制活性、一酸化窒素産生抑制活性、免疫調節活性、例えば遅延型過敏反応抑制活性、リンパ球幼若化反応抑制活性、混合リンパ球反応抑制活性、IgE産生抑制活性、カラゲーナン浮腫抑制活性等の生理活性を有し、これらの活性により、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有する医薬は、例えば生体防御機構に作用する医薬、例えば抗体産生機構に作用する製剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、抗リウマチ剤、インターフェロン誘発剤等、糖質代謝に作用する医薬、例えば糖尿病治療剤、病原生物に作用する医薬、例えば、抗菌剤、抗ウイルス剤等として有用である。従って本発明で得られる医薬は、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩に感受性を示す疾病用の医薬として、例えばがん、ウイルス性疾患、リウマチ、糖尿病、アレルギー、自己免疫疾患、炎症等の疾病的治療用医薬又は予防用医薬として極めて有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、例えばヒト前骨髓性白血病細胞HL-60、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞MOLT-3、肺がん細胞A-549、SV40形質転換肺細胞WI-38VA13、肝がん細胞HePG2、結腸がん細胞HCT-116、ヒト結腸がん細胞SW480、ヒト結腸がん細胞WiDr、胃がん細胞AGS、ミエローマ細胞等のがん細胞に細胞増殖抑制作用、制がん活性を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は制がん剤の有効成分として使用することができる。また、これらの化合物はがん細胞にアポトーシス誘発作用を有する。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩のがん細胞増殖抑制作用機作は本発明をなんら制限するものではないが、例えばがん細胞に対するアポトーシス誘発作用、トポイソメラーゼII阻害作用も本発明の制がん作用に包含される。

制がん作用を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は一般的には、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択され

る少なくとも 1 以上の化合物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターク、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分である本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明の制がん剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

制がん剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有されるシクロペンテノン及び／又はその光学活性体の量が成人 1 日当たり $0.1 \mu\text{g} \sim 200 \text{mg/kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は制がん作用を有するが、低濃度ではがん細胞の分化誘導能を有し、本発明の化合物若しくはその光学

活性体又はそれらの塩はがん細胞の分化誘導剤（脱がん剤）としても有用である。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とするがん細胞分化誘導剤は、上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

がん細胞分化誘導剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物の量が成人1日当たり $0\text{. }1\mu\text{g} \sim 100\text{ mg/kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

上記がん細胞分化誘導剤はがん細胞分化誘導方法に使用することができる。すなわち本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として使用することによりがん細胞を分化させることができ、該方法はがん細胞の分化誘導機構の解明、分化誘導剤のスクリーニング等に有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗菌作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗菌剤を製造することができる。当該製剤は上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

抗菌剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物の量が成人1日当たり $10\mu\text{g} \sim 20\text{ mg/kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。

本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を抗菌用飲食品の原料として用いても良い。またエタノール、グリシン、酢酸ナトリウム、アスコルビン酸、グリセリン脂肪酸エステル、食塩、E D T A等の他の抗菌性物質と組合せて使用しても良い。

本発明の抗菌剤は本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分とし、食品又は飲料の保存性を向上させる防腐剤として使用することができる。また、これらの化合物から選択される化合物を食品又は飲料に添加し、食品又は飲料を防腐する方法に使用することができる。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の食品又は飲料への添加量は食品又は飲料の種類により異なり、その目的に応じた量を添加すれば良い。

本発明の抗菌剤の使用方法として、食品又は飲料に適当な方法で添加する方法が行われる。通常の方法は食品又は飲料の製造工程中に添加するが、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を含有する溶液に食品を一定時間浸漬する方法も用いることができる。更にまた、食品中に添加する方法と浸漬方法を併用することもできる。

本発明の抗菌剤を防腐剤として用いることにより、食品又は飲料の保存性を一段と向上させることができる。また冷凍食品や冷菓等においては、冷凍前の加工工程において、汚染した微生物の増殖を抑制することができ、衛生上極めて好ましい結果を得ることができる。本発明の抗菌剤はグラム陽性細菌、グラム陰性細菌の両方に効果を有し、例えばメチシリン耐性黄色ブドウ球菌等の薬剤耐性菌、サルモネラ菌、エンテロトキシン生産性黄色ブドウ球菌、嘔吐型のバシリス セレウス、下痢型のバシリス セレウス、腸出血性大腸菌O—157等の食中毒菌に極めて有効である。更に火落菌にも有効である。また細菌起因性疾病の起因菌、例えば在郷軍人病の起因菌のレジオネラ ニューモフィラ (*L e g i o n e l l a p n e u m o p h i l a*)、食中毒起因菌のビブリオ パラハエモリチカス (*V i b r i o p a r a h a e m o l y t i c u s*)、潰瘍起因菌のヘリコ

バクター ピロリ (*Helicobacter pylori*)、胃腸炎起因菌のキャンピロバクター ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) 等、例えば *Legionella pneumophila* (ATCC 33153)、*Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802)、*Helicobacter pylori* (NCTC 11637)、*Campylobacter jejuni* (ATCC 29428) 等に抗菌作用を有し、また、酵母、カビ等の微生物にも有効である。なお本発明の抗菌剤を用い、衣服、敷布等の殺菌を行うことができ、本発明の抗菌剤を散布すること、本発明の抗菌剤での拭き取り等により、目的物の除菌、殺菌を行うことができる。例えばビルの冷房用水に添加することにより、在郷軍人病の予防を行うことができる。

本発明の抗菌剤は虫歯菌や歯周病菌にも抗菌活性を示し、本発明の抗菌剤を含有する口内用剤を提供することができる。口内用剤の形状は液状、ペースト状等の公知の形状とすることができます。口内用剤としては歯磨剤が例示される。歯磨剤としては液状でもよく、またペースト状、粉末状でもよく、公知の歯磨剤の形状とすることができます。歯磨剤中の本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の歯磨剤中の含有量は特に制限されず、虫歯菌や歯周病菌に対する有効濃度が含有されていればよい。歯磨剤中には公知の添加剤、例えば湿润剤、界面活性剤、結合剤、香料、甘味料等を添加すればよい。

本発明の抗菌剤を使用することにより抗菌性化粧料を提供することができる。抗菌性化粧料としては有効量の本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を含有するクリーム、乳液、ローション、洗顔料、パック等の基礎化粧料、口紅、ファンデーション等のメイクアップ化粧料、ポディソープ、石鹼等の形態に調製することができる。また、頭髪に対しても有効であり、ヘアートニック、ヘアーリキッド、ヘアーセットローション、ヘアープロー剤、ヘアークリーム、ヘアーコート等のヘアー製品やシャンプー、リンス、ヘアートリートメント等の頭髪用トイレタリー等のヘアーケア一製品の形態にすることができる。化粧料への配合量はその抗菌力により、適宜

決定すればよい。化粧料の他の成分は通常化粧料に配合されるものが使用できる。抗菌性化粧料はアトピー性皮膚炎の起因菌にも有効に作用し、アトピー性皮膚炎の改善、予防にも著効を有する。

本発明の抗菌剤を使用することにより浴用剤を提供することができる。本発明の浴用剤としては有効量の本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有する粉末浴用剤、顆粒浴用剤、固体浴用剤、液状浴用剤等の形態に調製することができる。浴用剤への配合量はその所望される抗菌力により適宜決定することができる。浴用剤の他の成分は通常浴用剤に配合されるものが使用できる。本発明の浴用剤はアトピー性皮膚炎の起因菌にも有効に作用し、アトピー性皮膚炎の改善、予防にも著効を有する。また浴場からの病菌の駆除にも有効である。

また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有する食品又は飲料は食中毒、胃腸炎等の改善及び／又は予防に極めて有用である。

本発明のアポトーシス誘発剤は、アポトーシス誘発性を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

アポトーシス誘発剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物の量が成人1日当たり0.1μg～100mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

なおアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死であると考えられている。すなわち何らかの外部的又

は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化され、この遺伝子を基にプログラム死遺伝子タンパク質が合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

本発明のアポトーシス誘発剤は、このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現させることができ、不要若しくは病原細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて有用なものである。

本発明のアポトーシス誘発剤はアポトーシス誘発方法に使用することができる。すなわち本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として使用することによりアポトーシスを誘発させることができ、該方法はアポトーシス誘発機構の解明、アポトーシス誘発剤、アポトーシス誘発阻害剤のスクリーニング等に有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗リウマチ作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗リウマチ剤を製造することができる。該医薬は上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

本発明の抗リウマチ剤の投与量は、適応症、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物の量が成人1日当たり0.1μg～200mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を本発明の医薬の原料として用いても良い。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は関節炎等への抗炎症作用、カラゲナン浮腫抑制作用、腫瘍壞死因子産生抑制作用、インターロイキン-10産生増強作用、一酸化窒素産生抑制作用、ファス抗原産生誘導作用、免疫

調節作用、例えば遅延型過敏反応抑制作用、リンパ球幼若化反応抑制作用、混合リンパ球反応抑制作用、IgE産生抑制作用等の多様な生理活性を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分とする抗炎症剤又は炎症予防剤、腫瘍壞死因子産生抑制剤又は腫瘍壞死因子産生予防剤、インターロイキン-10産生増強剤、免疫調節剤、一酸化窒素産生抑制剤、ファス抗原産生誘導剤、免疫調節剤、IgE産生抑制剤、遅延型過敏反応抑制剤、抗アレルギー剤等の医薬を上記抗リウマチ剤に準じ製剤化することができ、上記医薬に準じた方法で投与することができる。

これら製剤の投与量は、適応症、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物の量が成人1日当たり $0\text{. }1\text{ }\mu\text{g} \sim 200\text{ mg}/\text{k g}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。例えば抗炎症剤、腫瘍壞死因子産生抑制剤としては製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物の量は好適には成人1日当たり $10\text{ pg} \sim 50\text{ mg}/\text{k g}$ であり、一酸化窒素産生抑制剤としては製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物の量は好適には成人1日当たり $0\text{. }1\text{ }\mu\text{g} \sim 20\text{ mg}/\text{k g}$ であり、使用目的により製剤中の有効成分量を調節することができる。

本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

リウマチは骨膜細胞や軟骨細胞に障害が起こる自己免疫疾患であり、本発明の抗アレルギー剤は自己免疫疾患治療剤としても有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は慢性関節リウマチなどの臓器特異自己免疫疾患や炎症性疾患において、炎症を直接惹起していると考えられる、腫瘍壞死因子の産生を抑制し、Th1抑制サイトカインであるインター

ロイキン-10の産生を増強する。したがって炎症、例えば臓器特異自己免疫疾患であるリウマチ、特に慢性関節リウマチの症状が改善され、炎症マーカーであるC反応タンパク(CRP)値、リウマトイド因子(rheumatoid factor: RF)値、赤血球沈降速度(血沈)値が激減し、歩行困難等の合併症状も顕著に改善される。

腫瘍壞死因子は、腫瘍部位に出血性壞死を誘導する因子として発見されたが、現在では炎症を基本とした生体防御・免疫機構に広くかかわるサイトカインとして認識されている。この腫瘍壞死因子の産生調節機構の破綻は様々な不都合を宿主にもたらし、腫瘍壞死因子の過度又は未調節の産生は、慢性関節性リウマチ、リウマチ性脊髄炎、変形性関節症、痛風性関節炎、敗血症、敗血性ショック、内毒素ショック、グラム陰性菌敗血症、毒性ショック症候群、脳性マラリア、慢性肺炎、移植片対宿主反応、同種移植片拒絶反応、インフルエンザのような感染症による発熱及び筋肉痛、感染又は悪性腫瘍に対して二次的な悪液質、ヒト後天性免疫不全症候群(AIDS)に対して二次的な悪液質、AIDS、AIDS関連症候群、ケロイド形成、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、自己免疫糖尿病及び全身エリテマトーデス等の自己免疫疾患を含む、これらの多くの疾患に関連している〔モレキュラー メディシン(Molecular Medicine)、第33巻、第1010～1020頁、第1182～1189頁(1996)〕。本発明の腫瘍壞死因子産生抑制剤は、腫瘍壞死因子により媒介されるか又は悪化する病状の治療に有用である。また本発明により、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として使用する腫瘍壞死因子の産生の調節方法が提供される。また本発明により、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有し、腫瘍壞死因子により媒介されるか又は悪化する疾病の病状の改善用食品又は飲料、又は疾病予防用食品又は飲料が提供される。

一酸化窒素(以下、NOと略す)は内皮細胞由来血管平滑筋弛緩因子(EDRF)の本体である〔ネチャー(Nature)、第327巻、第524～526頁(1987)〕。本発明により本発明の化合物若しくはその光学活性体又は

それらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分として含有する NO 産生の抑制を必要とする疾病治療用医薬又は疾病予防用医薬が提供される。本発明において、NO 産生の抑制を必要とする疾病とは、特に限定はないが、例えば毒性ショックやある種のサイトカインによる治療等による全身性血圧低下、血圧応答低下、自己免疫疾患、炎症、関節炎、リウマチ性関節炎、糖尿病、炎症性腸疾患、血管機能不全、病因性血管拡張、組織損傷、心臓血管系虚血、痛感過敏症、脳虚血、血管新生を伴う疾病、がん等があり、特表平 9-504524 号、特表平 9-505288 号、特表平 8-501069 号、特表平 8-512318 号、特表平 6-508849 号の各公報に記載の疾病を含むものである。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分として含有する NO 産生抑制剤は NO 産生機構研究、NO 作用機作研究に有用であり、また NO 産生機構に関する物質のスクリーニングに使用することもできる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は NO 産生細胞に対して NO 産生抑制作用を示す。例えば、マクロファージ細胞株にエンドトキシン（リポポリサッカライド：LPS）を添加すれば誘導型 NO 合成酵素（NOS）が発現して NO が培地中に分泌されるが、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の共存下で LPS を作用させると NO 産生は抑えられる。LPS 処理で NO 産生を誘導した場合、NO の細胞障害活性によって細胞生存率は低下するが、LPS 処理時に本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を添加すると NO の産生が低下し、細胞に対する障害も減少する。

固体がんの増大に血管新生は必須であるが、欠陥内皮増殖因子／血管透過性亢進因子（VEGF）はこの過程に重要な役割を演じている。様々ながん細胞において VEGF が NO によって誘導される。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は NO 産生を抑制することによってがん細胞の VEGF 産生も抑制し、その結果、がん組織周辺での血管新生が阻害される。がん細胞を皮下に移植して固体腫瘍を形成させたマウスに本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与するとがん組織の周辺の血管の形成が不十分となり、がん

は脱落する。

ニトロソアミンは2級アミンにニトロ基が付加した一群の化合物で数百種類が知られており、その多くがDNAに損傷を加えることにより動物に対して発がん性を示す。ニトロソアミンはヒトの発がんにも深く関わっているとされており、通常胃の中で亜硝酸塩とアミンが反応することによって生成する。NOはpH中性の生理的条件下でもアミンと反応してニトロソアミンを生成する。また、疫学的にがんとの関係が高い肝吸虫感染患者や肝硬変患者においてNO産生は亢進している。したがって本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与してNO産生の亢進を防ぐことによって特にハイリスクグループの発がんを予防することができる。以上のように、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は発がんの抑制とがん組織における血管新生阻害という2段階で制がん作用を示す。

NOはまた、炎症性病変に特徴的に認められる浮腫、すなわち血管透過性亢進作用を誘発し〔マエダ(Maeda)ら、ジャパニーズ ジャーナル オブ カンサー リサーチ (Japanese Journal of Cancer Research)、第85巻、第331～334頁(1994)〕、また、炎症性メディエーターであるプロスタグランジン類の生合成を亢進させる〔サルベミニ(Salvemini)ら、Proceedings of National Academy of Sciences, USA (Proceedings of National Academy of Sciences, USA)、第90巻、第7240～7244頁(1993)〕。一方、NOはスーパーオキシドラジカルと速やかに反応してパーオキシナイトライトを生じ、パーオキシナイトライトが炎症性の細胞、組織障害を引き起こすとも考えられている。

活性化された免疫細胞が臓器に入り込みサイトカインを放出するとNOの産生が誘導される。インスリン依存型糖尿病は膵島 β 細胞が特異的に破壊されることによって引き起こされる疾患であり、NOによる破壊であるとされている。また、慢性関節性リウマチ、変形性関節リウマチ、痛風性関節炎、ベーチェット病に伴う関節炎の患者の病変部の関節液には同患者の正常な関節や健常人の関節の関

節液に比べて高濃度のNOが含まれている。これらの患者に本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与すると病変部におけるNO産生を抑制し、症状が改善する。

脳虚血中及び再灌流後にはNO産生が増大し、それに伴って脳組織が損傷を受ける。脳虚血時に患者に本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与することにより脳組織の損傷が軽減され、予後が改善される。

ファス抗原（APO-1抗原、CD95）と呼ばれる細胞表面抗原はアポトーシスを誘導する分子として注目されている〔セル（Cell）、第66巻、第233～243頁（1991）、ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン（J. Exp. Med.）、第169巻、第1747～1756頁（1989）、ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー（J. Biol. Chem.）第267巻、第10709～10715頁（1992）、ジャーナル オブ イムノロジー（J. Immunology）、第184巻、第1274～1279頁（1992）〕。

ファス抗原は、胸腺細胞、T細胞、細胞傷害性T細胞、B細胞あるいはNK細胞等の免疫系細胞に発現している。免疫系は外来の非自己抗原の侵入に際しては、免疫反応を惹起して非自己抗原を排除する。しかしながら、自己抗原に対しては免疫反応を示さず自己寛容が成立している。これは自己反応性を有するリンパ球系幹細胞が、クローン除去というネガティブセレクションを受けアポトーシスによる細胞死により排除されることによる。しかしながらファス抗原の遺伝子的欠陥等の生体の何らかの異常によりこれらの細胞がアポトーシスを受けなかつた場合には、例えば自己反応性T細胞が末梢に蓄積される。また正常な生体においては、免疫担当細胞であるB細胞についても自己寛容が成立しており、この自己反応性B細胞も通常、アポトーシスにより死に至るが、自己反応性B細胞がファス抗原の遺伝子的な欠陥等の異常によりアポトーシスを受けなかつた場合には、自己反応性B細胞が末梢に蓄積される。更に、関節リウマチの場合には、上記の自己反応性リンパ球の異常、滑膜細胞のターンオーバーの異常が病因の一端となっている。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とするファス抗原産生誘導剤は自己反応性リンパ球、ターンオーバーの異常により生体から排除され得なかつた不用の生体構成細胞のアポトーシス誘導に有用であり、ファス抗原産生誘導方法に使用することができる。また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有するファス抗原産生異常を伴う疾病的予防剤又は治療剤として有用である。本発明においてファス抗原産生異常を伴う疾病とは、特に限定は無いが、例えば自己反応性T細胞、自己反応性B細胞により惹起される自己免疫疾患、関節リウマチ等が例示され、WO 97/0965公報に記載の疾病を含むものである。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はインターロイキン-10産生増強作用、遅延型過敏反応抑制作用、リンパ球幼若化反応抑制作用、混合リンパ球反応抑制作用、IgE産生抑制作用、カラゲナン浮腫抑制作用等の免疫調節作用を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とする免疫調節剤はこれらの免疫系、免疫因子の異常が起因となる疾病的治療剤又は予防剤として有用である。

すなわちインターロイキン-10の産生低下によりTh1が活性化され、Th1優位な自己免疫の炎症が惹起される。この炎症は腎炎、肝炎等臓器特異的自己免疫疾患、及び移植片拒絶反応やアレルギー性接触性皮膚炎等の疾患に関与している。本発明の免疫調節剤はインターロイキン-10の産生を増強させ、Th1の活性を抑制することにより、これらの疾患の治療又は予防に有用である。

またリンパ球幼若化反応とは、マイトジエンがリンパ球表面の受容体に結合し、リンパ球を活性化させ、その分裂、増殖を促す反応である。混合リンパ球反応とは、同種異系の動物より得られたリンパ球を混合培養することにより、主要組織適合抗原の不一致によるリンパ球の活性化が誘導され、リンパ球の分裂、増殖が促進される反応である。上記免疫調節剤はこれらの反応を抑制し、リンパ球の異常亢進が起因となる自己免疫性疾患、例えば慢性腎炎、慢性大腸炎、I型糖尿病、慢性関節リウマチ等の慢性の疾患の治療又は予防に特に有用であり、また移

植片拒絶反応の抑制においても有用である。

カラゲナン足浮腫モデルは、起炎剤であるカラゲナンを足蹠部に皮下注射することにより、マクロファージ、好中球等の炎症細胞が誘導され、これらの細胞から產生された炎症性の因子により血管透過性が亢進し、浮腫が惹起される反応である。上記免疫調節剤の浮腫抑制作用は、血管透過性の亢進の制御を必要とする疾患、例えば慢性関節リウマチの治療又は予防に有用である。

喘息やアトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー疾患においてはマスト細胞からのケミカルメディエーターの放出がアレルギー反応において大きな役割を果たす。この反応は IgE が細胞膜上のレセプターに結合し、架橋することによって惹起され、本発明の免疫調節剤は IgE の產生を抑制し、IgE 产生により媒介されるか悪化する症状、例えば IgE が起因となるアレルギー疾患、例えば気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、じん麻疹、アナフィラキシーショック等の症状改善及び／又は疾患予防に極めて有用である。また本発明の免疫調節剤は遅延型過敏反応を抑制し、遅延型過敏反応を伴う疾病、例えば接触性過敏症、アレルギー性接触性皮膚炎、細菌アレルギー、真菌アレルギー、ウイルスアレルギー、薬物アレルギー、甲状腺炎、アレルギー性脳炎等の治療、予防において有用である。

近年、糖尿病の病理研究結果より、正常な脂肪細胞は全身でのインスリン作用が正常に行われるための重要な役割を果たし、糖代謝を円滑に進めるためには、正常な脂肪細胞が必要とされる〔実験医学、第 14 卷、第 61 ~ 68 頁 (1996)〕。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は前駆脂肪細胞、例えば線維芽前駆細胞の分化誘導能を有し、該細胞を脂肪細胞へ分化誘導する。そこで、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物を摂取することにより、正常な脂肪細胞が増加し、糖尿病の症状が改善される。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は血糖低下作用を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なく

とも 1 以上の化合物を有効成分とする糖尿病治療剤又は予防剤を作製することができる。

すなわち、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば糖尿病治療剤又は予防剤を製造することができる。当該製剤は上記制がん剤に準じ製剤化することができ、上記医薬に準じた方法で投与することができる。

糖尿病治療剤又は予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物の量が成人 1 日当たり 10 pg ~ 200 mg / kg である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を糖尿病改善又は予防用飲食品の原料として用いても良い。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩含有物を摂取することにより、糖尿病が改善され、尿糖量が激減する。また性機能低下等の合併症状も顕著に改善される。更に高脂血症が改善される。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は高脂血症改善作用、すなわち血清トータルコレステロール低下作用、血清トリグリセリド低下作用、血清遊離脂肪酸低下作用を有し、これらの作用を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば高脂血症治療剤又は高脂血症予防剤を製造することができる。当該製剤の製造は上記糖尿病治療剤又は予防剤に準じ行えば良く、また糖尿病治療剤又は予防剤に準じた方法で投与することができる。また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を高

脂血症改善又は予防用飲食品の原料として用いても良い。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の含有物を摂取することにより、高脂血症が改善され、血中脂質量が激減する。

また前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導能を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導剤を製造することができる。当該製剤の製造は上記糖尿病治療剤又は予防剤に準じ行えば良く、また糖尿病治療剤又は予防剤に準じた方法で投与することができる。

また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は腫瘍壞死因子産生抑制作用を示し、腫瘍壞死因子が原因となるインスリン非依存型糖尿病〔ネーチャー (Nature) 、第 389 卷、第 610 ~ 614 頁 (1997) 〕の治療、予防に有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗ウイルス作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗ウイルス剤を製造することができる。抗ウイルス剤の製造は上記制がん剤に準じ製剤化することができ、上記医薬に準じた方法で投与することができる。

抗ウイルス剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される 1 以上の物の量が成人 1 日当たり $0.1 \mu\text{g} \sim 20 \text{mg/kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を抗ウイルス用飲食品の原料として用いても良い。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、DNA ウィルス、RNA ウィルス、レトロウィルス、及びウイロイドに対して抗ウイルス活性を示

す。

従って、ヒト用抗ウイルス剤、非ヒト動物用抗ウイルス剤、例えば家畜、家禽、養殖動物、例えば魚類、エビ類等のウイルス病に有効な抗ウイルス剤、植物用抗ウイルス剤、例えば花卉類、野菜類等の農園芸作物のウイルス病に有効な抗ウイルス剤等、有用生物用の抗ウイルス剤として使用することができる。

動物に感染するDNAウイルスとしては例えばポックスウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、B型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、ポリオーマウイルス、エプスタインバールウイルス、バキュロウイルスが挙げられ、植物に感染するDNAウイルスとしては例えばカリフラワーモザイクウイルスが挙げられる。動物に感染するRNAウイルスとしては例えばロタウイルス、風疹ウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ジステンパーウイルス、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ヒトポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスが挙げられ、植物に感染するRNAウイルスとしては例えばタバコモザイクウイルス、麦類矮小ウイルス、イネ縞葉枯ウイルス、タバコ輪点ウイルスが挙げられる。レトロウイルスとしては例えば成人T細胞白血病ウイルス、ヒト後天性免疫不全ウイルスが挙げられ、ウイロイドとしては例えばジャガイモスピンドルチューバーウイロイドが挙げられる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は非ヒト哺乳動物、鳥、例えばニワトリ及び七面鳥、冷血動物、例えば魚のウイルス病の治療及び予防に有効であり、これらの化合物は下記の非ヒトウイルスに対して抗ウイルス活性を示す。サイルトイド ヘルペスウイルス1型、カプリトイド ヘルペス1型、ラガモルフ ヘルペスウイルス1型、ファシアニド ヘルペスウイルス1型、ファシアニド ヘルペスウイルス2型、ターキー ヘルペスウイルス1型、アナチド ヘルペスウイルス1型、キャット フィッシュ ヘルペスウイルス1型、エクトイド ヘルペスウイルス3型、ボビド ヘルペスウイルス1型、ボビド ヘルペスウイルス3型、ボビド ヘルペスウイルス4型、ピッグ ヘルペスウイルス1型、ピッグ ヘルペスウイルス2型、ミュリッド ヘルペスウイルス1型、セピド

ヘルペスウイルス1型、セピド ヘルペスウイルス2型、ツパイード ヘルペス
ウイルス1型、カニン ヘルペスウイルス1型、ヒライン ヘルペスウイルス1
型、エクイド ヘルペスウイルス1型、エクイド ヘルペスウイルス2型。

本発明の抗ウイルス剤を鳥類に注射するか又は飼料若しくは飲料水に添加する等の獣医学、飼育術において周知の方法によって、マーレック氏病等の鳥類のウイルス性疾患が本発明に使用する化合物によって、予防及び／又は治療される。またプール、水槽、保持タンク又は飼育領域の水、海水等に直接、本発明に使用する化合物を添加するか、又は飼料中に本発明に使用する化合物を混合して、ヘルペス類ウイルス、例えばプチナマズウイルス、ヘルペスーウイルス ソロモンス、ナーカ ウィルス等のウイルス感染によるプール、水槽、保持タンク又は飼育領域中の狭い区域に棲息する魚のウイルス病、例えばサケ科魚類の伝染性造血器壊死病、ヘルペスウイルス感染症又は伝染性膵臓壊死病、ニジマスのウイルス性出血性敗血症、コイの春ウイルス病、種々の魚のリンホシスチス病、海産魚・遡河魚のウイルス性赤血球壊死病、ヒラメ等のラブドウイルス病、ブリ稚魚等のウイルス性膵肝壊死病、トラフグ等の口白病等を同様に予防及び／又は治療し得る。なお本発明に使用する化合物、本発明の抗ウイルス剤を投与するに当つての正確な規制は、必然的に治療されている個々の被検体に関する必要性、治療の種類及び飼育者の判断次第である。

本発明の抗ウイルス剤が投与された非ヒト動物はその健康保持により、生存率、成長率、産卵率等の改善が顕著である。

本発明で使用する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はこれらのウイルスタンパクの合成を抑制し、ウイルスゲノムの合成も抑制することにより、強い抗ウイルス作用を示す。またこれらのウイルス感染細胞を選択的に死滅させる。

例えばヒト後天性免疫不全ウイルス（以下HIVと略記する）の感染患者においても、すべてのCD4陽性細胞にHIVが感染しているのではなく、一部の細胞にのみ感染している。本発明の抗ウイルス剤は、この感染細胞のHIV増殖を抑制しながら選択的に感染細胞を死滅させ、未感染細胞にウイルス抵抗能を誘導し、細胞

からのHIVの除去が可能となる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は肝機能改善作用、熱ショックタンパク誘導作用を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物を有効成分とする肝機能改善剤や熱ショックタンパク誘導剤を、上記抗ウイルス剤に準じ、製剤化することができ、抗ウイルス剤に準じた方法で投与することができる。

肝機能改善剤や熱ショックタンパク誘導剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物の量が成人1日当たり $0.1\text{ }\mu\text{g} \sim 20\text{ mg/kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物を肝機能改善用飲食品、熱ショックタンパク誘導用飲食品の原料として用いても良い。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を摂取することにより、肝機能障害も改善され、GOT、GPT値が正常化する。

また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は70kダルトン(HSP70)等の熱ショックタンパク誘導活性を有し、肝炎ウイルス、エイズウイルス、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ヘルペスウイルス等のRNAウイルス、DNAウイルスに対する抗ウイルス作用を有する。また、熱ショックタンパクはがん免疫に関与しており、これらの化合物はがん免疫にも有効である。更に抗炎症等生体防御作用をも有する。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を摂取することにより、インフルエンザウイルスによる風邪疾患等のウイルス性疾患が予防、治療できる。

なお熱ショックタンパクは細胞や個体が平常の温度よりも5~10°C程度高い温度変化を急激に受けたときに合成が誘導されるタンパクの総称であり、原核生

物から高等真核生物まで幅広く分布している。真核生物の熱ショックタンパクとしてはHSP90、HSP70、ユビキチン、HSP26等が知られている。その中でHSP70は分子シャペロンの一種であり、フォールディングが完了していない、または不完全にフォールディングしたタンパクに結合して立体構造の形成を助ける。熱ショックタンパクのアミノ酸配列は進化の過程でよく保存されており、HSP70は大腸菌のDnaKタンパクと相同である。ヒトには約10個のHSP70遺伝子が存在しているが、これらのあるものは構成的に発現しており、あるものは様々な刺激によって誘導される。熱ショックタンパクの合成は熱ショックのほかに様々な化学物質、酸化ストレス等の細胞障害によっても誘導される。

C. アミチラ (C. Amici) ら [ジャーナル オブ ビロロジー (Journal of Virology)、第68巻、第6890～6899頁 (1994)] は、 α 、 β -不飽和カルボニルを持つプロスタグラジンA₁の存在下でセンダイウイルスを感染させた動物細胞を培養するとHSP70とHSP90の合成が誘導され、HSP70の合成が誘導されている間はウイルスタンパクの合成が抑制されることを報告している。また、A. ロッシ (A. Rossi) ら [ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)、第271巻、第32192～32196頁 (1996)] は、2-シクロペンテン-1-オンがプロスタグラジンA₁と同様にHSP70の合成を誘導し、水疱性口内炎ウイルスタンパクの合成を抑制することを報告している。

本発明の化合物によるHSP70誘導能は10 μ Mでみられ、20～30 μ Mで最大となるが、これは2-シクロペンテン-1-オンがHSP70を誘導するには数百 μ Mの濃度を要することと比較すると極めて高い誘導能であるといえる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はこのように高い熱ショックタンパク誘導作用を持つことから、DNAウイルス、RNAウイルス、レトロウイルス、及びウイロイドに対して抗ウイルス活性を示す。これらのウイルス、ウイロイドには上記の各ウイルス、ウイロイドが例示される。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はがん遺伝子で形質転換されたがん細胞に対しても増殖抑制活性を有し、がん遺伝子による発がんを防止する作用を有する。

例えはパピローマウイルスはパポバウイルス科 (papovaviridae) 、パピローマウイルス属 (papillomavirus) のDNAウイルスであり、ヒトパピローマウイルス (HPV) としては、例えは子宮頸がんなどの原因となるHPV16型が知られている。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はHPV16型のがん遺伝子E7によってがん化した細胞に対し、増殖抑制効果を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として、ウイルス発がん細胞増殖抑制剤を提供することができ、がん遺伝子による発がんを防止することができる。

また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はイニシエーターとプロモーターによる2段階発がんの抑制作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として、化学発がん抑制剤を提供することができる。

したがって本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を含有する発がん予防用食品又は発がん予防用飲料を提供することができる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はIgE産生抑制作用、遅延型過敏反応抑制作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗アレルギー剤を製造することができる。当該製剤の製造は、上記抗制がん剤に準じ、製剤化することができる。また、本発明の抗アレルギー剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。例えは錠剤、丸剤、顆粒剤、散剤、液剤、懸濁剤、シロップ剤、カプセル剤は経口投与することができる。注射剤は、例えは静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与することができる。軟膏剤、クリーム剤等は経皮投与することができる。座剤は直腸投与することができる。また水性あるいは非水性

点眼剤を調製することができ、点眼剤で眼に投与する剤型としては眼軟膏剤、塗布液剤、散布剤、インサート剤等がある。更に吸入のためには、有効成分と慣用の製薬賦形剤との溶液又は懸濁液が用いられ、例えば吸入用エアゾールスプレーとして使用される。なお乾燥粉末状の有効成分を肺と直接接触できるようにする吸入器又は他の装置によっても投与することができる。

抗アレルギー剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物の量が成人1日当たり10 p g～50 m g／k gである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分としてIgE産生抑制剤、遅延型過敏反応抑制剤を製造することができる。これらの製剤は上記抗アレルギー剤に準じ製剤化することができ、上記抗アレルギーに準じた方法で投与することができる。

また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗アレルギー用食品又は抗アレルギー用飲料の原料として用いても良い。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を摂取することにより、IgE産生、遅延性過敏反応が起因となる疾病的症状が顕著に改善され、また該疾病的予防効果も優れている。

本発明の抗アレルギー剤はIgEの産生を抑制し、IgE産生により媒介されるか悪化する症状、例えばIgEが起因となるアレルギー疾患、例えば気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、じん麻疹、アナフィラキシーショック等の症状改善及び／又は疾患予防に極めて有用である。また遅延型過敏反応を抑制し、遅延型過敏反応を伴う疾病、例えば接触性過敏症、アレルギー性接触性皮膚炎、細菌アレルギー、真菌アレルギー、ウイルスアレ

ルギー、薬物アレルギー、甲状腺炎、アレルギー性脳炎等の治療、予防において有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は制がん活性、がん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性、トポイソメラーゼⅡ阻害活性、がん細胞分化誘導活性、抗リウマチ活性、慢性関節リウマチ抑制活性、ファス抗原産生誘導活性、抗菌活性、抗ウイルス活性、肝機能改善活性、熱ショックタンパク誘導活性、血液成分正常化活性、がん免疫増強活性、抗炎症活性、腫瘍壞死因子産生抑制活性、一酸化窒素産生抑制活性、免疫調節活性、例えば遅延型過敏反応抑制活性、リンパ球幼若化反応抑制活性、混合リンパ球反応抑制活性、IgE産生抑制活性、カラゲナン浮腫抑制活性等の生理活性を有し、これらの活性により、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有する食品又は飲料は、上記種々の生理活性を有する機能性食品又は機能性飲料として有用である。

なお本発明の食品又は飲料の製造においてはシクロペンテノンを含有する加熱処理物、該加熱処理物からの部分精製シクロペンテノン及び精製シクロペシテノン及びSH基含有化合物を使用し、製造工程中において生成する本発明の化合物も使用することができる。

すなわちシクロペンテノンを含有する加熱処理物、該加熱処理物からの部分精製シクロペンテノン及び精製シクロペンテノンから選択される原料及びSH基含有化合物の反応物である本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料は本発明の食品又は飲料に包含される。

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に有効量の生理作用を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物が含有されていれば良い。

食品又は飲料の製造においては、任意の工程で、加熱処理を行い、加熱処理物

中にシクロペンテノンを含有させ、SH基含有化合物と反応させれば良く、本発明の化合物を含有する加熱処理物を添加してもよい。また食品又は飲料やその原料を本発明の化合物を含有する加熱処理物へ添加し、該加熱処理物中の本発明の化合物を希釈してもよい。また、添加は1回又は数回に渡って行っててもよい。したがって、簡便に新規な生理作用を有する食品又は飲料を製造することができる。

本発明の食品又は飲料としては、制がん作用、抗菌作用、アポトーシス誘発性、抗ウイルス作用、肝機能改善作用等の生理機能を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ヅル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

本発明の食品又は飲料は生理活性を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を含有し、これらの化合物の有する種々の生理活性、制がん作用、抗菌作用、アポトーシス誘発作用、抗ウイルス作用、肝機能改善作用等によって、これらを摂取することにより発がん予防、がん抑制効果、ウイルス性疾患、糖尿病、リウマチ、アレルギー、自己免疫性疾患等の本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩に感受性を示す疾患の症状改善効果、予防効果また肝機能改善効果等を有する健康食品又は飲料であり、生体の恒常性の維持、特に胃腸健康保持に有用な食品又は飲料である。またその抗菌力により、極めて保存性の良い、食品又は飲料である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はこれらの生理活性の有効量を投与しても毒性は認められない。例えば経口投与の場合、式【VII】、式【VIII】、式【IX】、式【X】でそれぞれ表される化合物、若しくはそれらの光学活性体又はそれらの塩のいずれかを1000mg/kgでラットに単回経口投与しても死亡例は認められない。

以上、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はその種々の生理的機能により、医薬、食品、飲料等の広い分野において極めて有用な化合物で

ある。この本発明の化合物はシクロペンテノンと、SH基含有化合物、例えばSH基含有アミノ酸、又はその誘導体、例えばシステイン含有アミノ酸誘導体との反応物として、食品、飲料中でも生成し、人為的に生成されたこれらの化合物の使用も本発明に包含されるものである。

実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

参考例 1

10 g のD-グルクロン酸（シグマ社製 G 5269）を1リットルの水に溶解し、121°Cで4時間加熱した後約10 ml になるまで減圧下濃縮した。これに酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 混合液の上層40 ml を加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約10 ml まで濃縮した。

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲル BW-300 SP (2 × 28 cm、富士シリシア化学社製) にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 の上層を溶離液としてコンプレッサーで0.2 kg/cm² に加圧し、毎分5 ml の流速で分離を行った。1画分当たり10 ml になるようにフラクションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ61番から80番までの画分に高純度のシクロペンテノンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後40 ml のクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって100 mg のシクロペンテノンを得た。

この画分をパルパックタイプSカラム（宝酒造社製）を用いた順相HPLCで分離し、215 nm の紫外線吸収で検出したところ、純度は98%であった。

上記シクロペンテノン113.9 mg をエタノール2.85 ml に溶かした。このエタノール溶液にヘキサン／エタノール(94/6) 3.85 ml を更に加え、17 mg/ml のシクロペンテノン溶液を調製した。この液を0.5 μm のフィルターでろ過し、光学分割 HPLC 試料溶液とした。

この試料溶液を以下の条件で光学分割 HPLC を行い、前ピークの(-) 体シク

ロペンテノン及び後ピークの (+) 体シクロペンテノンのフラクションをそれぞれ集め、減圧乾固し、(-) 体シクロペンテノン 43.2 mg、(+) 体シクロペンテノン 43.0 mgをそれぞれ得た。

光学分割 HPLC 条件

カラム：キラールパック AS（ダイセル化学工業）2.0 cm×25.0 cm

カラム温度：40°C

移動相：ヘキサン／エタノール（94/6）

流速：14.0 ml/min

検出：UV 210 nm

試料注入量：150 μl (2.55 mg)

得られた (-) 体シクロペンテノン及び (+) 体シクロペンテノンは両者共に約1%のエナンチオマーを含有していたため再度上記の条件で光学分割した。その結果、前ピークの (-) 体シクロペンテノン 30.0 mg から 19.7 mg のエナンチオマーを含有しない (-) 体シクロペンテノンを、後ピークの (+) 体シクロペンテノン 37.4 mg から 27.7 mg のエナンチオマーを含有しない (+) 体シクロペンテノンをそれぞれ得た。なお (-) 体シクロペンテノン、(+) 体シクロペンテノンの光学分割HPLCの溶出時間はそれぞれ 33分、40分であった。

実施例 1

(1) 1M シクロペンテノン水溶液 100 μl と、NaOH で pH 4 に調整した 1M チュニステイン塩酸塩（ナカライテスク社製、103-13）100 μl を混合して 60°C で 16 時間反応させた。本反応物を 0.5 μm コスモナイスフィルター（ナカライテスク社製、440-84）によりろ過した後、0.1 % トリフルオロ酢酸（ナカライテスク社製、349-01）水溶液を移動相として毎分 0.5 ml の流速で、カプセルパックカラム C₁₈ S G 120 (6 mm × 250 mm : 資生堂社製) を用いて HPLC を行い、210 nm の吸光度で検出したところ、19.1 分と 19.5 分に主要なピークが見られたので分取し、減圧下濃縮乾固して 2 種のジアステレオマー、CM1 (19.1 分) と CM2 (19.5 分) を単離した。

(2) シクロペンテノンと L-システインとの反応物の構造

実施例 1 - (1) で単離した CM 1 と CM 2 の質量分析を DX 302 質量分析計（日本電子社製）を用いて行った。また、0.1 N の D C 1 重水溶液に溶解し、核磁気共鳴法（NMR）によってその構造を解析した。核磁気共鳴装置は JNM-A 500（日本電子社製）を用いた。紫外（UV）吸収スペクトルを UV-2500 分光光度計（島津製作所製）を用いて測定した。その結果を以下に示す。

CM 1

FAB-MS m/z 218 [M+H]⁺

マトリックスとしてグリセロールを用いた。

¹H-NMR

δ 2.32 (1H, dd, $J = 20.0, 1.5\text{ Hz}$, 5-H)、2.89 (1H, dd, $J = 20.0, 6.0\text{ Hz}$, 5-H)、3.01 (1H, dd, $J = 15.0, 7.0\text{ Hz}$, 1'-H)、3.09 (1H, dd, $J = 15.0, 4.5\text{ Hz}$, 1'-H)、4.01 (1H, m, 4-H)、4.16 (1H, d, $J = 7.0, 4.5\text{ Hz}$, 2'-H)、6.49 (1H, d, $J = 3.0\text{ Hz}$, 3-H)

UV: λ_{\max} nm 250 nm (水)

CM 2

FAB-MS m/z 218 [M+H]⁺

マトリックスとしてグリセロールを用いた。

¹H-NMR

δ 2.31 (1H, dd, $J = 20.0, 1.5\text{ Hz}$, 5-H)、2.87 (1H, dd, $J = 20.0, 6.0\text{ Hz}$, 5-H)、3.01 (1H, dd, $J = 15.0, 6.5\text{ Hz}$, 1'-H)、3.11 (1H, dd, $J = 15.0, 4.5\text{ Hz}$, 1'-H)、4.00 (1H, m, 4-H)、4.20 (1H, d, $J = 6.5, 4.5\text{ Hz}$, 2'-H)、6.46 (1H, d, $J = 3.0\text{ Hz}$, 3-H)

但し、¹H-NMRの化学シフト値はHODの化学シフト値を4.65 ppmとして表した。

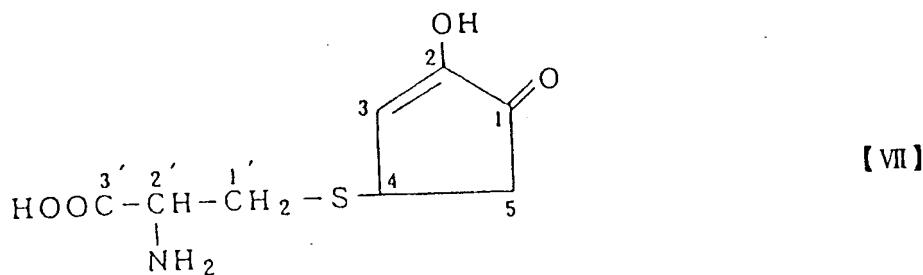
またCM1を0.1N DCl重水溶液に溶解し、JNM-A500を用いて¹³C-NMRスペクトルを測定した。

¹³C-NMR

δ 30.3 (1'-C), 39.4 (4-C), 42.0 (5-C), 53.4 (2'-C), 132.8 (3-C), 154.6 (2-C), 171.1 (3'-C), 205.5 (1-C)

但し、¹³C-NMRの化学シフト値はジオキサンの化学シフト値を67.4 ppmとして表した。

なお、¹H-NMR、¹³C-NMRのピークの帰属の番号は下記式【VII】のとおりである。



またCM1とCM2の等量混合物(CMと呼ぶことにする)の赤外吸収(IR)スペクトルをFTIR-8000PC赤外分光光度計(島津製作所製)を用いて測定した。その結果を示す。

IR

ν _{KBr} _{max} cm⁻¹ 3000, 1705, 1625, 1201

拡散反射法によって行った。

これらの値から、CM1とCM2のどちらか一方が式【VIII】で示される構造、他方が式【IX】で示される構造であることが明らかになった。

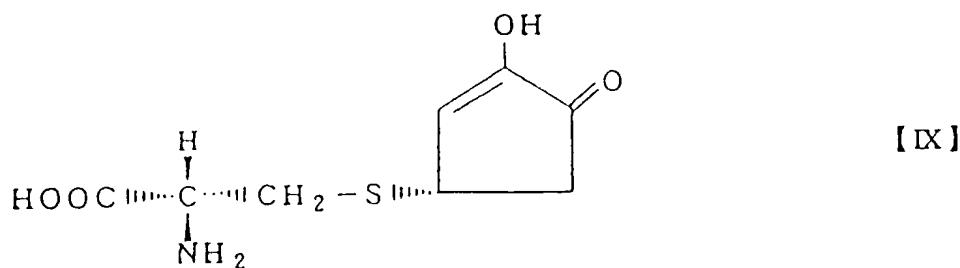
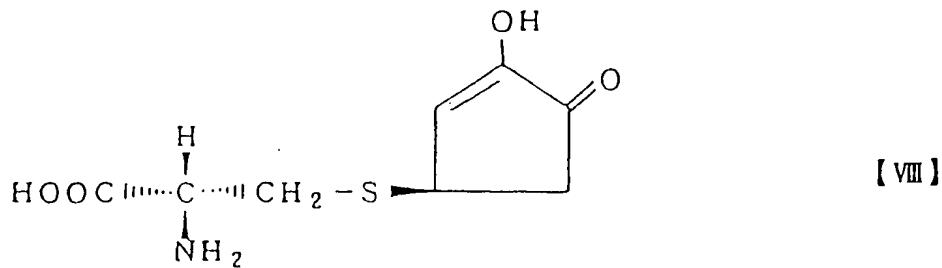


図1にCM1のマススペクトル、図2にその¹H-NMRスペクトル、図3にCM1のUV吸収スペクトル、図4にCM2の¹H-NMRスペクトル、図5にCM1の¹³C-NMRスペクトル、図6にCMのIR吸収スペクトルを示す。図1において横軸はm/z値、縦軸は相対強度(%)を示す。図2、図4及び図5において横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図3において横軸は波長(nm)、縦軸は吸光度を示す。また図6において横軸は波数(cm⁻¹)、縦軸は透過率(%)を示す。

実施例 2

(1) シクロペンテノンの1M水溶液100μlと200mMグルタチオン(還元型:ナカライトスク社販売:170-10)水溶液(pH3.0)500μlを混合し、60℃で5時間反応させた。この反応液を0.5μmコスモナイスフィルターでろ過し、以下の条件でHPLCで分離した。

カラム: TSKgel ODS-80Ts (5μm)、20mm×25cm

移動相: A O. 1%TFA水溶液

B 0. 1% TFA / 50% アセトニトリル水溶液

流速： 7. 5 ml / 分

グラジエント： 10分間移動相A → 55分かけて移動相AからA : B = 1 : 1
→ 15分かけて移動相A : B = 1 : 1 から移動相B

検出： 220 nmにおける吸光度

上記反応液 200 μl を HPLC にかけ、保持時間 35. 7 分と 36. 1 分のピーグを分取し、それぞれ減圧下濃縮乾固して 2 種のジアステレオマー、GM1 と GM2 を単離した。GM1 の収量は 2. 5 mg、GM2 の収量は 3. 0 mg であった。

このクロマトグラムを図 7 に示す。すなわち、図 7 は保持時間と吸光度の関係を示す図であり、横軸は保持時間（分）、縦軸は 220 nm における吸光度である。

(2) 実施例 2 - (1) で調製した GM1、GM2 の等量混合物 (GM と略称する) の構造を解析した。核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは JNM-A500 (日本電子社製)、質量スペクトル (MS) は DX302 質量分析計 (日本電子社製)、紫外 (UV) 吸收スペクトルは UV-2500 分光光度計 (島津製作所製)、赤外吸収 (IR) スペクトルは FTIR-8000PC 赤外分光光度計 (島津製作所製) を用いて測定した。その結果を以下に示す。

¹H-NMR

δ 2. 09 (2H, m, 5' -H), 2. 28 (1H, dd, J = 13. 0, 20. 0 Hz, 5 -H), 2. 44 (2H, m, 4' -H), 2. 78 (1H, dd, J = 8. 5, 14. 0, 1' -H), 2. 85 又は 2. 89 (1H, dd, J = 3. 0, 6. 0 Hz, 5 -H), 2. 92 又は 2. 95 (1H, dd, J = 1. 0, 5. 5 Hz, 1' -H), 3. 86 (2H, s, 9' -H), 3. 95 (2H, m, 4 -H, 6' -H), 4. 46 (1H, m, 2' -H), 6. 47 又は 6. 49 (1H, d, J = 3. 0 Hz, 3 -H)

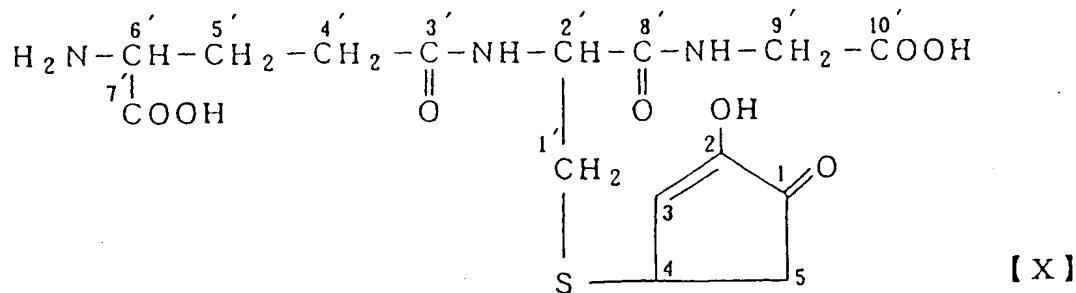
試料は 0. 1 N DCl 重水溶液に溶解し、HOD の化学シフト値を 4. 65 ppm として表した。

¹³C-NMR

δ 26.3 (5' - C), 31.7 (4' - C), 31.9 又は 32.1 (1' - C), 39.3 (4 - C), 41.9 (9' - C), 42.2 又は 42.3 (5 - C), 53.3 (6' - C), 54.1 (2' - C), 133.5 (3 - C), 154.4 (2 - C), 173 付近 (3' - C, 7' - C, 8' - C, 10' - C), 205.8 (1 - C)

試料は 0.1 N DCl 重水溶液に溶解し、ジオキサンの化学シフト値を 6.7 ppm として表した。

なお、¹H-NMR、¹³C-NMR のピークの帰属の番号は下記式【X】のとおりである。



FAB-MS

m/z 404 ($M + H$)⁺, 426 ($M + Na$)⁺

グリセロールをマトリックスに用いた。

UV λ_{max} 251 nm (水)

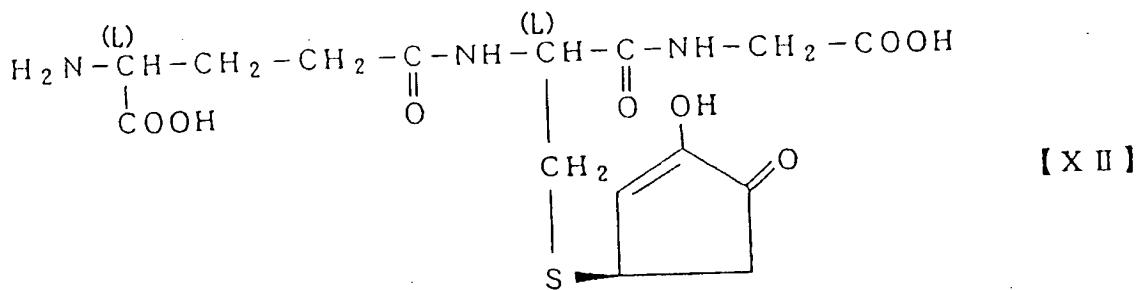
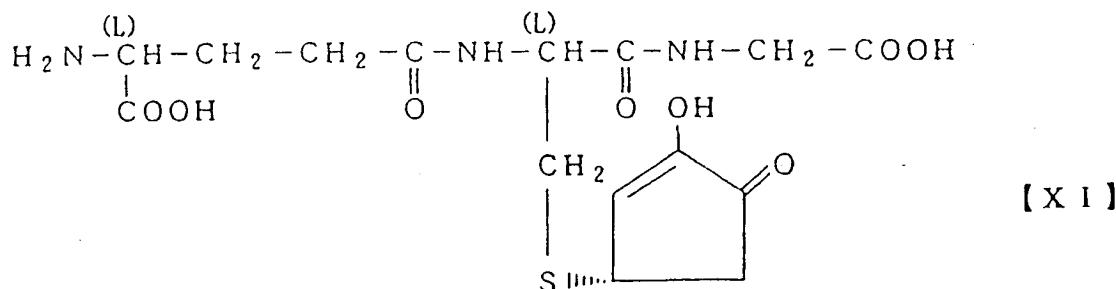
IR ν^{KBr}_{max} cm⁻¹ 2949, 1710, 1660, 1539, 1404, 1203

拡散反射法によって行った。

図 8 ~ 図 12 にその結果を示す。すなわち、図 8 は GM の ¹H-NMR スペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図 9 は GM の ¹³C-NMR スペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図 10 は GM のマススペクトルを

示す図であり、横軸は m/z 値、縦軸は相対強度 (%) を示す。図 1-1 は GM の UV 吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波長 (nm) 、縦軸は吸光度を示す。図 1-2 は GM の IR 吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波数 (cm^{-1}) 、縦軸は透過率 (%) を示す。

以上の結果から、GM1、GM2 は 2-ヒドロキシ-4-グルタチオン-S-イール-2-シクロ penten-1-one (2-hydroxy-4-glutathion-S-yl-2-cyclopenten-1-one) ジアステレオマーであり、その一方は式【X I】に示す構造、他方は式【X II】に示す構造であることが明らかになった。



実施例 3

(1) シクロ pentenone と L-システイン塩酸塩（ナカライトスク社製、103-13）を各々の濃度が 10 mM になるようにリン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) に溶解して 37 °C で 30 分間反応させた。本反応物を 0.5 μm コスモナイスフィルター（ナカライトスク社製、440-84）によりろ過した後、0.1% トリフルオロ酢酸（ナカライトスク社製、349-01）水溶液を移動相として

毎分 1 ml の流速で、 T S K - G e l O D S 8 0 T s (4. 6 mm × 2 5 0 mm; 東ソー社製) を用いて H P L C を行い、 2 1 0 nm の吸光度で検出したところ、シクロペンテノンと ラシスティンのピークが減少し、 4. 0 分と 4. 3 分に主要なピークが新たに出現した。

その結果を図 1 3 に示す。すなわち図 1 3 は溶出時間と 2 1 0 nm における吸光度の関係を示す図であり、横軸は溶出時間 (分) 、縦軸は 2 1 0 nm における吸光度を示す。

なお図 1 3 中 3. 1 分が ラシスティンの溶出位置、 4. 9 分がシクロペンテノンの溶出位置である。

(2) シクロペンテノンと ラシスティン塩酸塩を各々の濃度が 1 0 0 μM になるようにリン酸緩衝食塩水 (pH 7. 2) に溶解して 3 7 °C での 2 1 5 nm における吸光度の経時変化を U V - 2 2 0 0 分光光度計 (島津製作所製) を用いて測定した。その結果、反応時間と共に吸光度は低下し、 5 0 0 秒後からはほぼ一定になった。その結果を図 1 4 に示す。すなわち図 1 4 は ラシスティンを用いた場合の反応時間と 2 1 5 nm における吸光度の関係を示す図であり、横軸は反応時間 (秒) 、縦軸は 2 1 5 nm における吸光度を示す。

次に ラシスティン塩酸塩の代りにグルタチオン (還元型、ナカライトスク社販売、 1 7 0 - 1 0) を用いて同様の操作を行ったところ、反応時間と共に 2 1 5 nm における吸光度は低下し、 2 0 0 0 秒からはほぼ一定になった。その結果を図 1 5 に示す。すなわち図 1 5 はグルタチオンを用いた場合の反応時間と 2 1 5 nm における吸光度の関係を示す図であり、横軸は反応時間 (秒) 、縦軸は 2 1 5 nm における吸光度を示す。

(3) シクロペンテノンと ラシスティン塩酸塩を各々の濃度が 1 0 mM になるようにリン酸緩衝食塩水 (pH 7. 2) に溶解して 3 7 °C で 3 0 分間反応させた。本反応物を 0. 5 μm コスマニスフィルターによりろ過した後、 0. 1 % 酢酸水溶液を移動相として毎分 1 ml の流速で、 T S K - G e l O D S 8 0 T s (4. 6 mm × 2 5 0 mm; 東ソー社製) と A P I 3 0 0 (サイエックス社製) を用いて高速液体クロマトグラフィー質量分析を行った。質量分析はポジ

ティブイオンモードで行った。その結果、 $m/z = 236.1 [M+H]^+$ のシグナルが観測され、反応により新たに生じた物質の分子量は 235 であった。

その結果を図 16 と図 17 に示す。すなわち図 16 は上記した本発明の 1 例の反応物のクロマトグラムであり、横軸は保持時間（分）、縦軸は全イオン強度（相対値）を示す。また、図 17 は図 16 の 2.99 分に溶出する画分の質量スペクトルを示す図であり、横軸は m/z 、縦軸はイオン強度（相対値）を示す。なお、図 16 の 3.15 分と 3.24 分にそれぞれ溶出する画分の質量スペクトルにおいても、 $m/z = 236.1 [M+H]^+$ のシグナルが観測された。

(4) シクロペントノンと α -システイン塩酸塩を各々の濃度が 100 μM になるようにリン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) に溶解して 37°C で 50 分間反応させた。反応前と反応後の紫外吸収スペクトルを UV-2200 分光光度計（島津製作所製）を用いて測定した。

その結果を図 18 と図 19 に示す。すなわち、図 18 は溶解直後の反応液の紫外吸収スペクトルを示す図であり、図 19 は 50 分間反応後の反応液の紫外吸収スペクトルを示す図である。図 18 と図 19 において横軸は波長 (nm)、縦軸は吸光度を示す。

α -システイン塩酸塩の代りにグルタチオンを用いて同様の操作を行った。

その結果を図 20 と図 21 に示す。すなわち、図 20 はグルタチオンを用いた場合の溶解直後の反応液の紫外吸収スペクトルを示す図であり、図 21 はグルタチオンを用いた場合の 50 分間反応後の反応液の紫外吸収スペクトルを示す図である。図 20 と図 21 において横軸は波長 (nm)、縦軸は吸光度を示す。

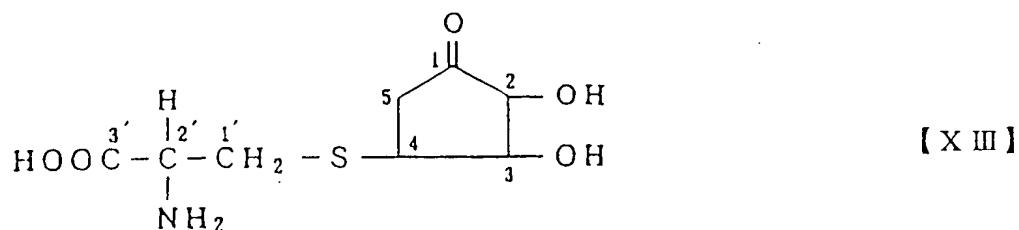
(5) 60 μl の 1.4M シクロペントノン重水溶液、80 μl の 1M α -システイン重水溶液、及び 160 μl の重水で調製したリン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) を混合し、37°C で 3 時間反応させた。この反応液の ^{13}C -核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを JNM-A500 (日本電子社製) を用いて測定した。その結果を以下に示す。

^{13}C -NMR

δ 33 付近 ($1' - C$)、43 付近 ($4-C$ と $5-C$)、55 付近 ($2' - C$

) , 7.5付近と7.8付近(3-C) , 8.0付近と8.1付近(2-C) , 1.73付近(3'-C) , 2.15付近と2.17付近(1-C)

なお、¹³C-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式【X III】のとおりである。



この反応物の¹³C-NMRスペクトルを図22に示す。図22において横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

この反応での生成物は4種類のジアステレオマーの混合物であるので各炭素原子につき最大4個のシグナルが見られ、この反応液中に生成した反応物の化学構造は前記式【IX】で表されるシクロペンタノンチオ誘導体である。

以上の結果より、シクロペンテノンとシステインとの反応により生成する図13の溶出時間4.0~4.3分をピークとする反応物の化学構造は前記式【IX】で表されるシクロペンタノンチオ誘導体であり、この溶出時間4.0~4.3分をピークとする反応物を分取し、前記式【IX】で表されるシクロペンタノンチオ誘導体(以下、CDと称す)を得た。

実施例 4

(1) シクロペンテノンの1.4M水溶液60μl、200mMグルタチオン(還元型、ナカライトスク社販売、170-10)水溶液(NaOHでpH7.0に調整)600μl、及びリン酸緩衝食塩水(pH7.2)1340μlを混合し、37°Cで1時間反応させた。この反応液700μlを0.5μmコスモナイスフィルターでろ過し、以下の条件でシクロペンテノンとグルタチオンの反応物(以下、GD1と称す)をHPLCで分離した。

カラム： T S K g e l O D S - 8 0 T s (5 μ m) 、 2 0 m m \times 2 5 c m

(東ソー社製)

移動相： A 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 (T F A 、 メルク社製、 8 2 6 2) 水溶液

B 0 . 1 % T F A / 5 0 % アセトニトリル (ナカライテスク社製、 0 0 4 - 3 0) 水溶液

流速： 9 m l / 分

グラジエント： 4 0 分間移動相 A \rightarrow 4 0 分かけて移動相 A から B \rightarrow 以後移動相 B

検出： 2 2 0 n m における吸光度

上記反応液 5 0 0 μ l を H P L C にかけ、 保持時間 2 7 . 7 分のピークを分取し、 凍結乾燥して 5 m g の G D を単離した。

このクロマトグラムを 図 2 3 に示す。 すなわち、 図 2 3 は保持時間と吸光度の関係を示す図であり、 横軸は保持時間 (分) 、 縦軸は 2 2 0 n m における吸光度である。

(2) 実施例 4 - (1) で調製した G D 1 の構造を解析した。 核磁気共鳴 (N M R) スペクトルは J N M - A 5 0 0 (日本電子社製) 、 質量スペクトル (M S) は D X 3 0 2 質量分析計 (日本電子社製) 、 紫外 (U V) 吸収スペクトルは U V - 2 5 0 0 分光光度計 (島津製作所製) 、 赤外吸収 (I R) スペクトルは F T I R - 8 0 0 0 P C 赤外分光光度計 (島津製作所製) を用いて測定した。 その結果を以下に示す。

¹H - N M R

δ 2 . 0 7 (2 H, m, 5' - H) , 2 . 1 7 (1 H, d - t , J = 2 0 . 0 , 1 1 . 0 H z , 5 - H) , 2 . 4 5 (2 H, m, 4' - H) , 2 . 8 8 (1 H, m, 1' - H) , 2 . 9 5 (1 H, m, 5 - H) , 3 . 0 8 (1 H, m, 1' - H) , 3 . 1 9 (1 H, m, 4 - H) , 3 . 7 6 (1 H, m, 3 - H) , 3 . 8 6 (3 H, m, 6' - H, 9' - H) , 4 . 0 9 (1 H, d, J = 1 0 . 5 H z , 2 - H) , 4 . 4 9 (1 H, m, 2' - H)

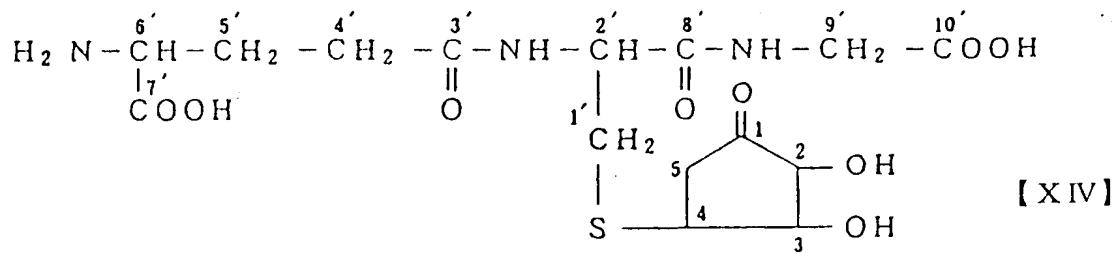
試料は重水に溶解し、HODの化学シフトを4.65 ppmとして表した。

¹³C-NMR

δ 26.4 (5' - C), 31.7 (4' - C), 33.3 (1' - C), 41.9 (9' - C), 42.4 又は 42.6 (4 - C), 42.8 (5 - C), 53.4 (6' - C), 54.1 (2' - C), 79.4 又は 79.6 (3 - C), 81.1 (2 - C), 173付近 (3' - C, 7' - C, 8' - C, 10' - C), 214.9 (1 - C)

試料は重水に溶解し、ジオキサンの化学シフト値を67.4 ppmとして表した。

なお、¹H-NMR、¹³C-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式【XIV】のとおりである。



FAB-MS

m/z 422 [M + H]⁺

グリセロールをマトリックスに用いた。

UV

末端吸収

IR

$\nu_{\text{KBr max}}^{\text{cm}^{-1}}$ 3275, 1749, 1654, 1541, 1203, 1145

拡散反射法によって行った。

図24～図27にその結果を示す。すなわち、図24はGDの¹H-NMRス

ペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図25はGDの¹³C-NMRスペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図26はGDのマススペクトルを示す図であり、横軸はm/z値、縦軸は相対強度 (%)を示す。図27はGDのIR吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波数 (cm⁻¹)、縦軸は透過率 (%)を示す。

以上の結果からGDは前記式【X】に示す2,3-ジヒドロキシ-4-グルタチオン-S-イル-シクロ pentanon (2,3-dihydroxy-4-glutathion-S-yl-cyclopentane) であることが明らかになった。なおGDは4種のジアステレオマーの混合物であり、GDよりそれぞれのジアステレオマーを分離した。

実施例 5

(1) 2.5 × 10⁵ 個の前骨髓性白血病細胞HL-60細胞 (ATCC CCL-240) を含む4.5mlの10%ウシ胎児血清含有 RPMI 1640 培地に、各々0.5mlの0.2 mM CM、0.8 mM CM、又は1.6 mM CMを添加し、5%炭酸ガス存在下37°Cで24時間又は48時間培養した後、生細胞数を測定した。

その結果、CMは強いがん細胞増殖抑制活性を示した。また各細胞増殖抑制濃度において細胞にアポトーシス小体が形成された。

その結果を図28に示す。すなわち図28は添加した試料、すなわちCMの培養液中の濃度と生細胞数の関係を示す図であり、横軸はCMの濃度 (μM) を、縦軸は培養液5ml中に含まれる生細胞数 (× 10⁵ / 5ml) を示す。図28中において白四角印 (□) はCM添加、24時間培養を、黒四角印 (■) はCM添加、48時間培養をそれぞれ示す。また白三角印 (△) は試料無添加時の24時間培養、黒三角印は試料無添加での48時間培養をそれぞれ示す。

(2) 8、40、200、又は1000 μM GM水溶液、あるいは対照として水10μlを96穴マイクロタイープレートの各ウェルに添加した。HL-60 (ATCC CCL-240) を10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640 培地に5 × 10⁴ 個/mlとなるように懸濁し、90μlずつ上記マイクロタ

イタープレートの各ウェルに分注し、5% CO₂ 存在下37°Cで48時間培養した。5mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT;シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液10μlを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロパノール100μlを加えてよく攪拌し、590nmにおける吸光度を測定した。

その結果、40μM GM添加区分(終濃度4.0μM)において細胞の増殖が見られなかった。よって、GMは4.0μM濃度でHL-60細胞の増殖を完全に抑制することが明らかになった。また各細胞増殖抑制濃度において細胞にアポトーシス小体が形成された。

(3) 100、200、又は400μMのGM又はCM水溶液、あるいは対照として水10μlを96穴マイクロイタープレートの各ウェルに添加し、実施例5-(2)と同様の方法で、HL-60増殖抑制活性を測定した。但し、細胞増殖の度合いを、試料添加区分の590nmにおける吸光度の、対照の水添加区分の590nmにおける吸光度に対する比率(%)で表した。その結果を表1に示す。

表 1

	GM	CM
40 μM	3.2	2.8
20 μM	1.8	16.1
10 μM	14.8	48.9

(4) 56°C、30分間処理したウシ胎児血清(ギブコ社製)を10%含む RPMI 1640培地(日本社製)にて37°Cで培養したHL-60細胞(ATCC CCL240)を上記培地で 2.5×10^5 個/4.5mlとなるように懸濁した。この懸濁液に対して100μM GM水溶液0.5mlを添加し(終

濃度 $10\text{ }\mu\text{M}$)、5%炭酸ガス存在下、37°Cで24時間、48時間及び72時間培養した。

培養細胞をトリパンブルーで染色して生細胞数と死細胞数を計数したところ、 $10\text{ }\mu\text{M}$ GM添加区分では対照の水添加区分に比べて生細胞数及び細胞生残率が顕著に減少していた。また、培養細胞を光学顕微鏡で観察し、核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成を確認した。更に、細胞からDNAを抽出してアガロースゲル電気泳動を行ったところ、クロマチン単位でのDNAの断片化が認められた。なお、対照の水添加区分においてはこれらの現象は観察されなかつた。

その結果を図29に示す。すなわち図29はHL-60の培養液に $10\text{ }\mu\text{M}$ GMを添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数($\times 10^5$ 個/ 5 ml)を示す。図29中において白四角印(□)は $10\text{ }\mu\text{M}$ GM添加を、白丸印(○)は水添加の対照を示す。

(5) 4. 12. 12. 3. 37. 0. 111. 333. 又は $1000\text{ }\mu\text{M}$ GD水溶液、あるいは対照として水 $10\text{ }\mu\text{l}$ を96穴マイクロタイヤープレートの各ウェルに添加した。HL-60(ATCC CCL-240)を10%ウシ胎児血清を含む RPMI 1640培地に 5×10^4 個/ ml となるように懸濁し、 $90\text{ }\mu\text{l}$ ずつ上記マイクロタイヤープレートの各ウェルに分注し、5% CO₂存在下37°Cで48時間培養した。 $5\text{ mg}/\text{ml}$ の3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT; シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液 $10\text{ }\mu\text{l}$ を加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロパンノール $100\text{ }\mu\text{l}$ を加えてよくかくはんし、590 nmにおける吸光度を測定した。

その結果、 $37.0\text{ }\mu\text{M}$ GD添加区分(終濃度 $3.70\text{ }\mu\text{M}$)において細胞の増殖が見られなかった。よって、GDは $3.70\text{ }\mu\text{M}$ 濃度でHL-60細胞の増殖を完全に抑制することが明らかになった。また各細胞増殖抑制濃度において

細胞にアポトーシス小体が形成された。

(6) リン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) にシクロペンテノンが 5.5 mM、L-システイン塩酸塩が 8.0 mM になるように溶解し、pH 7.2 で 37°C、15 分間反応させた。この反応液の一部を 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を移動相とし、毎分 1 ml の流速で、TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm × 250 mm、東ソー社製) カラムを用いた逆相 HPLC で分析したところ、シクロペンテノンは見られなかった。この反応溶液は 5.5 mM CD 含有溶液である。

実施例 5-(4) と同様に、各々 100、200、又は 400 μM GD 又は CD 水溶液のがん細胞増殖抑制活性を測定した。但し、細胞増殖の度合いを、試料添加区分の 590 nm における吸光度の、対照の水添加区分の 590 nm における吸光度に対する比率 (%) で表した。

その結果を表 2 に示す。

表 2

	GD	CD
40 μM	2.1	5.3
20 μM	5.8	56.2
10 μM	47.2	89.0

表 2 に示すように GD、CD はがん細胞増殖抑制活性を示した。また各細胞増殖抑制濃度において細胞にアポトーシス小体が形成された。

以上、実施例 5 に示すように、各化合物はがん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性を示した。また各種ジアステレオマーも同様の効果を示した。

実施例 6

GM を生理的食塩水で所定の濃度に希釈し、以下の試験を行った。

(1) M eth A 細胞 (2×10^6 細胞/マウス) を 8 週齢の雌性 BALB/c マウス (体重約 20 g) の腹部に皮下注射した。その後、引き続いて同じ箇所

に5日間連続してGM(5mg/kg/日)を皮下注射した。一方コントロール群には生理的食塩水を同様に皮下注射した。2週間後にマウス腹部に形成されたがん組織を摘出して、その重量を測定した。コントロール群と比較し、GM投与群では顕著ながん増殖抑制作用が認められた。またCM、CD、GDについても同様な結果を得た。

(2) マウス白血病P-388(1×10^6 cells/マウス)を7週齢の雌性DBA/2マウス(体重約20g)に腹腔内注射した。その後、5日間連続してGM、CM、GD又はCD(10mg/kg/日)を腹腔内注射した。一方コントロール群には生理的食塩水を同様に腹腔内注射した。それぞれ8匹ずつの2群において、マウスの生存数、平均生存日数、延命率を算定した。各試料投与群においてコントロール群と比べ平均生存日数が延長し、顕著な延命効果が認められた。またSarcoma-180/ICR系マウス、IMC/CDF1マウス、EAC/DDYマウスをそれぞれ用いた系においても同様な延命効果を示した。

以上、実施例6に示すようにGM、CM、GD又はCDは制がん効果を示した。また各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 7

Bacillus subtilis IFO3021を感受性ブイヨン培地(ニッスイ社製)で1晩培養した(種培養)。600nmにおける吸光度を測定し、あらかじめ作成した、生菌数と600nmにおける吸光度の関係を示す検量線から生菌数を計算した。新鮮な感受性ブイヨン培地で 1×10^6 個/mlとなるように種培養液を希釈し、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに $180\mu l$ ずつ分注した。GMの4mg/ml及び2mg/ml水溶液又は水を各ウェルに $20\mu l$ ずつ加え、37°Cで1晩静置培養した(本培養)。一方、種培養液の一部を滅菌水で希釈し、感受性ブイヨン寒天平板培地に塗布して37°Cで1晩培養後、コロニーを計数して正確な生菌数を測定した。

各ウェルの培養液を滅菌水で希釈して感受性ブイヨン寒天平板培地に塗布し、37°Cで1晩培養後、コロニーを計数して生菌数を測定した。

その結果、 4 mg/m l GM添加区分（終濃度 $400 \mu\text{g/m l}$ ）での生菌数は $4 \cdot 4 \times 10^7$ 個/ m l であり、水添加区分の $1 \cdot 3 \times 10^8$ 個/ m l に比べて減少していた。よって、GMは $400 \mu\text{g/m l}$ において上記被検菌に対して増殖抑制作用を示した。CM、GD、CD又はこれらの各ジアステレオマー、GMのジアステレオマーについても同様の結果を得た。また、これらの化合物は他の細菌に対しても同様の抗菌活性を示した。

実施例 8

(1) 8週齢の雌性CDF1系マウス（日本エスエルシー社より7週齢、体重 20 g で購入し、1週間予備飼育）を用いLPS（リポポリサッカライド：シグマ社）を腹腔内投与（ $10 \mu\text{g}/\text{マウス}$ ）し、エンドトキシンショックモデルを作製した。GMはLPS投与の30分前に、それぞれ 100 、 1000 mg/kg の用量で経口投与した。LPS投与1時間後にマウスより採血し、血清を分離し、血清中腫瘍壞死因子- α 量を市販のELISAキット（エンドジェン社製）にて測定した。結果を表3に示す。すなわち、蒸留水を投与したコントロール群に対し、GM 1000 mg/kg 投与群で有意に腫瘍壞死因子産生が抑制された。

表 3

群	投与量 mg/kg	匹数	血清腫瘍壞死因子量 (ng/m l)	
			平均	± S.E.
対照群		4	2.32	± 0.15
GM投与群	000	5	1.16	± 0.26
	100	5	2.22	± 0.26

(2) 8週齢の雌性CDF1系マウスの腹腔内にパラフィンオイル（コスモバイオ社） 2 ml を投与し、腹腔マクロファージ（Mφ）を誘導した。パラフィンオイル投与1週間後にマウスの腹腔内にRPMI-1640培地（ギブコ社） 4 ml を

注入し、よくマッサージした後、回収し、腹腔細胞を得た。

腹腔細胞はRPMI-1640 培地で2回洗浄した後、10%牛胎児血清(FCS:ハイクローン社)を含んだRPMI-1640 培地に懸濁し、細胞濃度を 1×10^6 cells/mlに調整した。調製した細胞液1mlを24穴プレートに播種し、37°C CO₂インキュベーターで2時間培養した。培養後上清に含まれる非接着細胞を除去し、接着細胞を腹腔Mφとして用いた。

プレートの各穴に10%FCSを含んだRPMI-1640 培地800μlを加え、次いで生理食塩水(大塚製薬社製)に溶解した1、10、100、1000μMのGMを100μl添加し37°C CO₂インキュベーターで1時間培養した。

培養後100ng/mlのLPS(シグマ社製)を100μl添加し、更に24時間培養した。培養終了後、培養上清を回収し產生された腫瘍壞死因子-α量を市販のELISAキット(エンドジェン社製)を用いて定量した。

結果を図30に示す。すなわち図30はGM量と腫瘍壞死因子產生量の関係を示す図であり、縦軸は腫瘍壞死因子產生量(pg/ml)、横軸はGM濃度(μM)を示す。また棒グラフはGM非添加の対照を示す。

GMは10μM以上の濃度においてLPSが誘発するマウス腹腔マクロファージからの腫瘍壞死因子產生を著明に抑制した。

以上、実施例8に示すようにGMは腫瘍壞死因子產生抑制作用を示した。またCM、GD、CD、又はこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 9

6週齢の雄性ルイスラット(セアック吉富社より5週齢、体重約130gで購入し、1週間の予備飼育)を用い、慢性関節リウマチ動物モデルであるカラゲナン誘発足浮腫モデルを次のように作製し、被験薬を評価した。

実験開始18時間前から絶食したラットに蒸留水(大塚製薬社製)で10、100mg/mlとなるように調製したGMを、10ml/kgの投与量で経口投与した。

被験薬投与0.5時間後に生理食塩水(大塚製薬社製)に懸濁して1%の濃度

に調整したカラゲナン（ワコー社製）を $100\mu l$ ／ラットで右足足蹠に注射し、足浮腫を惹起した。カラゲナン注射3時間後にラットの右足容積をラット足容積測定装置（ウゴバジール社製）で測定した。なお測定値はカラゲナン投与前に測定した各ラットの右足容積から増加率を算定して表示した。

結果を図31に示す。すなわち図31はGM量と足浮腫増加率の関係を示す図であり、縦軸は増加率（%）、横軸はGM投与量（mg/kg）を示す。

GMは 100 mg/kg の投与量から有意な抑制作用を認めた。

またCM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 10

GMのNO産生抑制活性及び細胞障害抑制活性をマウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞(ATCC TIB 71)及びLPSを用い、以下のように測定した。

1.5×10^6 個のRAW264.7細胞を含む 5 ml の 10% ウシ胎児血清（ギブコ社製）含有フェノールレッド不含 2 mM L-グルタミン（ライフテックオリエンタル社製、25030-149）含有ダルベッコ改良イーグル培地（ライフテックオリエンタル社製、11054-020）を、6穴の組織培養プレートにおいて 5% 炭酸ガス存在下 37°C で12時間培養した後、 $50\mu l$ の $50\mu\text{g/ml}$ LPS（シグマ社製、L-2012）を加え、各々のウエルに各々 $50\mu l$ の $250\mu\text{M}$ GM又は $100\mu\text{M}$ GMを加えて、更に12時間培養した後、NOが培地中で酸化されることによって生ずる NO_2^- 及び生細胞数の測定を行った。なお、対照としてLPSを加えない区及びGMを加えない区を設定した。

NO_2^- の測定には各ウエルから $100\mu l$ の培養上清を分離し、 $10\mu l$ の $50\mu\text{g/ml}$ 2,3-ジアミノナフタレン（同仁化学研究所社製、341-07021）溶液（ 0.62 N 塩酸溶液）を加え室温で15分間放置し、 $5\mu l$ の 2.8 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、生じたナフタレントリアゾールの蛍光をタイターテックフルオロスキャナーII（大日本製薬社販売）を用いて励起波長 355 nm 、測定波長 460 nm にて蛍光測定した。実験はすべて2連で行い、この平均値からLPS非添加の対照値を控除して、LPS添加区分の値に対する各区分の相対値で比較した。

その結果、GMはLPSによりRAW264.7細胞に誘導されるNO産生を抑制し、更に、LPSによるRAW264.7細胞に対する細胞障害を抑制した。

その結果を図32、図33に示す。図32は培養液中のGM濃度とNO₂⁻濃度の関係を示す図であり、縦軸はNO₂⁻濃度の相対値(%)を示す。図33はGM存在下の培養時間と生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液5ml中に含まれる生細胞数($\times 10^5 / 5\text{ml}$)を示す。図33において、白四角(□)はLPS非添加を、白ひし形(◇)はLPS添加を、白丸(○)は2.5 μM GM添加を、白三角(△)は2.5 μM GM+LPS添加を、黒四角(■)は1 μM GM+LPS添加を表す。

以上、GMはNO産生抑制作用を示した。またCM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 11

慢性関節リウマチ患者の滑膜から樹立された線維芽細胞株であるDSEK細胞(埼玉医科大学総合医療センター第2内科保存細胞株)を10%ウシ胎児血清(�BS、ギブコ社製、26140-079)含有イスコブ改変ダルベッコ培地(IMDM、ギブコ社製、12440-053)で5%炭酸ガス存在下、37°Cでコンフルエントになるまで培養し、トリプシン-EDTA(ギブコ社製、25300-054)で細胞をはがして集めた。この細胞を25000個/mlとなるように上記培地に懸濁し、96穴マイクロタイプレートの各ウェルに100 μlずつ分注した。培養5日後、ほぼコンフルエントになった時点で培地を捨て、2、2.5、5、10、20又は30 μMのGMを含有する上記培地を加えた。24時間、48時間又は72時間培養後、10 μlのプレミックスWST-1(宝酒造社製、MK400)を加えて37°Cで4時間反応させ、450 nmにおける吸光度(A₄₅₀)から650 nmにおける吸光度(A₆₅₀)を差し引いた値を細胞増殖度とした。

その結果は表4の通りであった。

表 4

濃度 (μM)	$A_{450} - A_{650}$	
	24時間	48時間
0	0. 846	1. 270
2. 5	0. 768	1. 133
5	0. 621	0. 942
10	0. 420	0. 486
20	0. 238	0. 185
30	0. 241	0. 196

24時間培養、48時間培養とともに5 μM 以上のGMを添加した区分で水添加の対照に比べて細胞増殖が抑制されており、10 μM のGMを添加した区分でアポトーシスの小体の形成が見られた。20 μM 以上のGMを添加した区分では生細胞はほとんど見られなかった。

以上、GMは滑膜細胞にアポトーシス誘発作用、増殖抑制作用を示した。またCM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 12

(1) ヒトT細胞性白血病細胞株であるJ u r k a t 細胞 (ATCC TIB-152) 及びM o l t - 3 細胞 (ATCC CRL-1552) を10%ウシ胎児血清 (FCS、バイオウィタカー社製) を含むRPMI 1640 培地 (ギブコBRL社製) にて、5% CO₂ 存在下、37°Cで培養し、0、5、10又は20 μM のGMを含む上記培地に 5×10^5 個/m²になるように細胞を懸濁し、24時間培養した。細胞増殖はMTT法 [モスマン (Moermann) ら、ジャーナル オブ イムノロジカル メソッズ (J. Immunol. Methodo

ds)、第65巻、第55~63頁(1983)]を用い、細胞増殖度を560nmにおける吸光度で測定した。

その結果、水添加の対照に比べて両細胞株とも $10\text{ }\mu\text{M}$ GM添加区分では約50%、 $20\text{ }\mu\text{M}$ GM添加区分では75%以上、細胞増殖が抑えられた。 $5\text{ }\mu\text{M}$ 以下のGMを添加しても細胞の増殖に有意な影響はなかった。

以上のように、GMはT細胞性白血病細胞株であるJurkat細胞及びMolt-3細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。

その結果を図34と図35に示す。すなわち、図34はJurkat細胞の増殖に対するGMの影響を示す図であり、図35はMolt-3細胞の増殖に対するGMの影響を示す図である。図34と図35において、横軸はGMの濃度(μM)を、縦軸は560nmにおける吸光度を示す。

(2) Jurkat細胞及びMolt-3細胞におけるファス抗原発現(産生誘導)に対するGMの影響を以下のようにして測定した。0、1、5、10又は $20\text{ }\mu\text{M}$ のシクロペンテノン又はGMを含む10%FCS含有RPMI1640培地で 5×10^5 個/mlのJurkat細胞又はMolt-3細胞を5%CO₂存在下、37°Cで24時間培養し、ムンカー(Munkler, R.)の方法(アナルズ オブ ヘマトロジー(Ann. Hematol.)第70巻、第15~17頁(1995))に従って抗ファス抗体(ベーリンガー・インゲルハイム社製)を用いて、2ステップ免疫染色した。

染色した細胞 1×10^4 個の蛍光強度をフローサイトメーター(オーソサイトロン:オーソ・ダイアグノティック・システムズ社製)を用いて測定し、一定値以上の蛍光強度を示す細胞をファス抗原発現細胞としてその比率を計算した。

その結果、両細胞株において、GMを添加した場合には $1 \sim 10\text{ }\mu\text{M}$ の範囲でファス抗原発現細胞の比率が濃度依存的に上昇し、 $20\text{ }\mu\text{M}$ 添加では $10\text{ }\mu\text{M}$ と同程度であった。

その結果を図36と図37に示す。すなわち図36はMolt-3、図37はJurkat細胞におけるファス抗原の発現を示す図である。図36と図37において横軸はGMの濃度(μM)、縦軸はファス抗原発現細胞の比率(%)を示

し、GMによるファス抗原産生誘導作用が認められた。

(3) 10 μM GMを添加して実施例12-(2)と同様の条件でMo1t-3細胞を1、3、6、12又は24時間培養し、実施例12-(2)と同様の方法でファス抗原発現細胞の比率を測定した。

その結果、10 μM GMを添加した場合、ファス抗原発現細胞の比率は培養12時間後に上昇し、24時間では更に上昇した。

その結果を図38に示す。すなわち図38はMo1t-3細胞に10 μM GMを添加して培養したときのファス抗原発現細胞の比率の変化を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸はファス抗原発現細胞の比率(%)を示す。

以上、実施例12に記載のようにGMによるファス抗原産生誘導作用が確認された。またCM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 13

KK-A'マウス(オス、4週令)を日本クレア社より購入し、10週令まで飼育後、GMを21日間経口投与して、血糖、血中インスリン及び脂質に及ぼす影響を検討した。GMは30、100、300mg/kgの用量を用いた。血糖値はGM投与の各群で低下した(図39)。血清インスリン値はGM投与の各群で低下した(図40)。血清脂質に対して、血清総コレステロール値はGM投与群で低下し(図41)、血清トリグリセリド値はGM投与群で低下し(図42)、血清遊離脂肪酸値はGM投与群で低下した(図43)。

すなわち図39はGM投与量と血糖値の関係を示す図であり、図中縦軸は血清グルコース値(mg/dl)、横軸はGM投与量(mg/kg)を示す。図40はGM投与量と血清インスリン値の関係を示す図であり、図中縦軸は血清インスリン値(μU/ml)、横軸はGM投与量(mg/kg)を示す。図41はGM投与量と血清総コレステロール値の関係を示す図であり、図中縦軸は血清総コレステロール値(mg/dl)、横軸はGM投与量(mg/kg)を示す。図42はGM投与量と血清トリグリセリド値の関係を示す図であり、図中縦軸は血清トリグリセリド値(mg/dl)、横軸はGM投与量(mg/kg)を示す。図4

3はGM投与量と血清遊離脂肪酸値の関係を示す図であり、図中縦軸は血清遊離脂肪酸値 ($\mu\text{Eq}/\text{リットル}$)、横軸はGM投与量 (mg/kg)を示す。なお図中*はターキーズマルチプル比較試験により、GM無投与群に対する有意差 $p < 0.05$ を、**は $p < 0.01$ を意味する。

なお動物は生理食塩水 ($5\text{ml}/\text{kg}$)、GMの30、100、300mg/ $5\text{ml}/\text{kg}$ の4群構成で、各群10例とした。各試験物質は1日1回21日間経口投与し、最終投与日に、試験物質投与4時間後にエーテル麻酔し、下腹部大静脈より採血した。血清インスリンは、酵素-免疫法（市販キット：グライザムインスリン-EIA TEST、和光純薬社製）にて測定した。血清中の糖、トリグリセリド及び遊離脂肪酸は、それぞれヘキソキナーゼ-G6PDH法、GPO-DAOS法及びACS-ACOD法で自動分析装置（7070形：日立製作所製）を用い測定した。血清総コレステロール値はコレステロールオキシダーゼ-DAOS法で自動分析装置（7070形：日立製作所製）を用い測定した。

以上の結果よりGMに血糖、インスリン及び脂質低下効果が認められた。またCM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 14

(1) $2 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ のHL-60 (ATCC CCL-240) を含む10%牛胎児血清含有RPMI1640培地5mlを6穴プレートの各ウェルに入れ、 37°C 、5%CO₂存在下で24時間培養した後、最終濃度が、0、0.5、1.0、3.0、5.0、10.0、20.0 μM になるようにGMを添加し、更に8時間培養を続けた。

培養終了後、細胞数を計測した後、細胞を遠心分離で回収し、PBSで洗浄して、GM処理細胞を調製した。また、 45°C 、10分間熱処理を行った後、同様に培養した細胞も調製した。

これらの処理細胞を用い、モレキュラークローニング (Molecular Cloning) [コールドスプリングハーバー ラボラトリー プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1989)] 記載の方法に従ってSDS-PAGEを行った。処理細胞は、 $2.5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ になるようにSDS-PAGE Sample bufferに懸濁し

、この細胞懸濁液を100 °Cで10分間処理した後、5μl ずつを2枚のSDS-PAGEゲル（5%スタッキングゲル、10%セパレーションゲル）にアプライし、電気泳動を行った。一方のゲルは、クマシーブリリアントブルーR 250で染色し、他方のゲルは、Polyvinylidene difluoride transfer membrane [ImmobilonTM : ミリポア (MILLIPORE) 社製 Cat. # IPVH000-10] にブロッティングした。このメンブレンをBlock Ace (大日本製薬株式会社 Cat. # UK-B25) で4°C一晩ブロッキングした。

このブロッキングしたメンブレンに熱誘導される70kDa の熱ショックタンパクと特異的に反応するモノクローナル抗体HSP 72/73(Ab-1) [オンコジーン リサーチ プロダクツ (Oncogene Research Products) 社製 Cat. # HSP01] を反応させた後、0.05% Tween20 を含むTBSで洗浄し、更に、TBSで洗浄した。次いで、Peroxidase複合二次抗体HRP-RabbitAnti Mouse IgG (H+L) [ZYMED ラボラトリース社 (ZYMED Laboratories, Inc.) 製 Cat. # 61-6520] を反応させ、先の操作と同様に洗浄した。このように一次抗体、二次抗体と反応させたメンブレンに、ケミルミノール試薬 RENAISSANCE™ [デュポン NEN (Dupont NEN) 社製 Cat. # NEL-100] を反応させた後、X線フィルムで感光して70kDa の熱ショックタンパクの誘導を検出した。

その結果、GMの添加により70kDa の熱ショックタンパクの誘導が認められた。その誘導の強弱は表5に示した。なお表5中、+は誘導の強さを表し、+が多いほど誘導が強いことを意味する。また-は誘導が認められなかつたこと、±は誘導がわずかであることを意味する。

表 5

処理細胞	熱ショックタンパク誘導
45°C 10分間熱処理	+++
0 μ M GM	-
0.5 μ M GM	±
1.0 μ M GM	±
3.0 μ M GM	+
5.0 μ M GM	+
10 μ M GM	++
20 μ M GM	++

表 5 に示すように GM に HSP70 の誘導能があることが明らかになった。

(2) 最終濃度が、0、10、20、30、40、50 μ M になるように CM を培養細胞に添加し、実施例 14-(1) 記載の方法で HSP70 の発現を測定した。

その結果、CM による 70kDa の熱ショックタンパクの誘導が確認された。その誘導の強弱は表 6 に示した。なお表 6 中、+ は誘導の強さを表し、+ が多いほど誘導が強いことを意味する。また - は誘導が認められなかつたこと、± は誘導がわずかであることを意味する。

表 6

処理細胞	熱ショックタンパク誘導
45°C10分間熱処理	+++
0 μM CM	-
5 μM CM	-
10 μM CM	+
20 μM CM	++
30 μM CM	++
40 μM CM	+
50 μM CM	+

以上、実施例 1 4 に示す様に、GM、CMは熱ショックタンパク誘導作用を示した。またGD、CD、またこれらの各ジアステレオマー、GM、CMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 1 5

2×10^5 個/ $m l$ のCEM-S S細胞 (ATCC CCL-119) とHIV-1 Bに感染したCEM-S S細胞 (細胞の90%以上がHIV-1 Bに感染している: CEM-3 Bと略称する) に0、4、8、16 μMのGMを添加して1日間培養し、生細胞数と死細胞数を計数して細胞生存率を算出した。その結果、0、4、8 μMになるようにGMを添加した場合、CEM-S S細胞は生存率が低下していないのに対し、CEM-3 B細胞は添加したGMの濃度に依存して生存率が顕著に低下した。更に、16 μMの添加では、CEM-S S細胞の生存率も低下したが、それ以上に、CEM-3 B細胞の生存率は、著しく低下していた。すなわちGMは抗HIV作用を示した。

その結果を図4 4に示す。すなわち、図4 4は添加したGM濃度と細胞生存率の関係を示す図であり、横軸は添加したGM濃度 (μM) 、縦軸は1日間培養後

の細胞生存率（%）を示す。白四角はCEM-S Sを用いた場合の結果であり、黒丸はCEM-3 B細胞を用いた場合の結果である。

(2) 実施例15-(1)記載のCEM-3 B細胞を1日間培養した後の培養上清中に含まれるp24抗原の濃度を測定した。その結果、添加したGM濃度に応じてp24濃度が減少し、抗HIV作用が認められた。その結果を図45に示す。すなわち図45は添加したGM濃度と培養上清中のp24生産量の関係を示す図であり、横軸はGM添加量(μM)、縦軸はp24生産量(n g/ml)を示す。

以上、実施例15に示すようにGMはHIV感染細胞に対して選択的に殺細胞効果を示し、HIVに対して抗ウイルス作用を示した。またCM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 16

(1) G418耐性遺伝子を発現するコントロールプラスミドpcD2-Y [Mol. Cell. Biol. 第7巻、第2745～2752頁(1987)]、およびHPV16型E7とG418耐性遺伝子の両方を発現できるプラスミドpcD2-16E7 [Jpn. J. Cancer Res. 第82巻、第1340～1343頁(1991)]で大腸菌E. coli HB101に形質転換し、L-プロス培地で培養し、集めた菌体よりプラスミドを抽出し、塩化セシウム密度勾配超遠心にて精製し、遺伝子導入用ベクタープラスミドとした。

NIH3T3細胞は37°C、5%CO₂条件下、10%仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地中にて培養した。

精製したプラスミド10 μgをNIH3T3細胞にカチオニックリポソーム(TransIT-LT-1, 宝酒造社製)を用いて導入し、細胞を37°C、5%CO₂条件下、G418(GIBCO)を0.4mg/ml含む10%仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地で2週間選択し、得られたコロニーをクローニングして、コントロールベクターを導入したNIH3T3細胞、及びHPV16型E7によってがん化させたNIH3T3細胞をそれぞれ9株ずつ樹立した。

コントロールベクターを導入した細胞株をNIH3T3/Y-1、NIH3T3/Y-2、NIH3T3/Y

-3、NIH3T3/Y-4、NIH3T3/Y-5、NIH3T3/Y-6、NIH3T3/Y-7、NIH3T3/Y-8およびNIH3T3/Y-9とした。

E7を導入した細胞株をNIH3T3/E7-1、NIH3T3/E7-2、NIH3T3/E7-3、NIH3T3/E7-4、NIH3T3/E7-5、NIH3T3/E7-6、NIH3T3/E7-7、NIH3T3/E7-8およびNIH3T3/E7-9とした。

(2) NIH3T3細胞、コントロールベクターを導入した細胞株、およびE7を導入した細胞株を100mmの組織培養プレートにて10%仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地で50～70%コンフルエントにまで増やし、PBSで洗浄後、0.25%トリプシン-EDTA溶液で細胞を剥がし、10%仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地5mlに懸濁した。

懸濁液の一部をとり、ノイバウエル型血球計算板にて細胞密度を計算した。得られた数字を元に10%仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地にて希釈し、直径60mmの組織培養プレートに200細胞/プレートになるように播き、3mlの培地中で培養を開始した。培養開始から24時間後、GMを5μMになるように添加した。さらに24時間後、新しい培地と交換しGMを5μMになるように添加した。

以後は2～3日毎に培地を交換しGMを5μMになるように添加した。対照実験区として、GMを添加しないプレートを用意し、同じように培養した。培養はそれぞれ3連で行った。9日間培養後、メタノールで固定してギムザ液(GIBCO)でコロニーを染色した。

なおNIH3T3、NIH3T3/Y-1およびNIH3T3/E7-2を用いて評価した。

染色したコロニーを計数した結果を表7に示す。E7を導入した細胞は、コントロール細胞に比べてGMへの感受性が高く、GMはがん遺伝子形質転換細胞に選択的に作用した。またCM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

表 7

細胞	コロニー数（平均±SD）	
	対照	GM処理
NIH3T3	91.7±11.9	79.0±2.6
NIH3T3/Y-1	83.3±8.4	72.0±9.5
NIH3T3/E7-2	67.3±3.2	13.3±3.2

実施例 1 7

(1) トポイソメラーゼII [トポジエン (TOPOGEN) 社製、2単位/ μ l] 2 μ l、10倍濃度緩衝液 [0.5M Tris-HCl (pH 8.0)、1.2M KCl、0.1M MgCl₂、5mM アデノシン三リン酸、5mM ジチオスレイトール] 2 μ l、0.1% ウシ血清アルブミン (宝酒造社製) 2 μ l、蒸留水 11 μ l 及び対照の蒸留水又は試料 (50、100、200、500、1000又は2500 μ MのGM) 2 μ lを混合したのに、0.25 μ g/ μ l pBR322 DNA (宝酒造社製) 1 μ lを添加して37°Cで反応させた。30分間反応後、1% ドデシル硫酸ナトリウム、50% グリセロール、0.02% ブロモフェノールブルー水溶液 2 μ lを添加して反応を停止した。

アガロースL03 (宝酒造社製) とTAE緩衝液 [40mM Tris、5mM 酢酸ナトリウム、1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、酢酸でpH 7.8に調整] を用いて作製した1% アガロースゲルに上記反応液 20 μ lをアプライし、TAE緩衝液中で電気泳動を行った。泳動後、ゲルを1 μ g/m² エチジウムブロミド水溶液に浸漬し、紫外線を照射してDNA電気泳動パターンを観察した。なお、水添加の対照ではDNAが超らせん型か

ら弛緩型に完全に変化するが、トポイソメラーゼⅡ活性が阻害されると超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害される。

その結果を表8に示す。

表 8

反応液中の濃度 (μM)	阻害活性
0	—
5	—
10	+
20	++
50	++
100	+++
250	+++

水添加の対照ではDNAが超らせん型から弛緩型に完全に変化したが、10 μM 以上のGM濃度でDNAの超らせん型から弛緩型への変化が一部又は完全に阻害され、GMのトポイソメラーゼⅡ阻害活性が確認された。表8において、—は超らせん型から弛緩型に完全に変化していることを、+は中程度の、++は大半の超らせん型が残っていることを、+++は超らせん型が全く減少していないことを示す。

(2) 実施例17-(1)と同様の方法でGMのトポイソメラーゼⅠ阻害活性を測定した。但し、トポイソメラーゼⅡの代わりにトポイソメラーゼⅠ [トポジエン社製、0.01単位/ μl]、10倍濃度緩衝液として100mM Tris-HCl (pH 7.9)、10mM EDTA、1mM スペルミジン、50%グリセロールを用いた。また、試料として最終濃度1mMとなるようGMを添加した。

その結果、1mM GMでトポイソメラーゼⅠは阻害された。

以上、正常細胞では分裂期のみに一過的に発現しているが、がん化により全細胞周期を通じて高発現するようになるトポイソメラーゼⅡや、がん化により発現量や活性が増大するトポイソメラーゼⅠに対し、GMは阻害活性を示した。またCM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 18

C57BL/6 マウス（メス、5週齢、体重約20g）は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育の後、実験に用いた。遅延型過敏反応の惹起抗原であるヒツジ赤血球（清水実験材料）を生理食塩水（大塚製薬）で3回洗い 1×10^9 cells/mlに調製し、 $200\mu l$ をマウスの腹腔内に注射して抗原感作した。

感作から5日後に同様に調製した抗原 $40\mu l$ を右足足蹠に注射して抗原誘発し、足浮腫を惹起した。GMは1群5匹のマウスに抗原感作日から1日1回、3日間腹腔内に $30\text{mg}/\text{kg}$ 又は $300\text{mg}/\text{kg}$ を投与した。

抗原誘発から2日後にマウスの右足容積を足浮腫測定装置（ウゴバジル社）で測定し、遅延型過敏反応の指標とした。測定値は抗原誘発前に測定したマウスの右足容積からの増加率を算定して表示した。

結果を図46に示す。すなわち図46はGMの遅延型過敏反応抑制作用を示す図であり、縦軸は増加率（%）、横軸はGM投与量（ mg/kg ）を示す。

GMは 30 、 $300\text{mg}/\text{kg}$ の投与で有意な遅延型過敏反応抑制作用を示した。またCM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様の結果を得た。

実施例 19

1群5匹の5週令のWistar系雄性ラット（日本エスエルシー社）に、卵白アルブミン（シグマ社）の 0.01% 生理食塩水溶液 $100\mu l$ 及びアラム（Alum）[商品名イムジェクト アラム（Inject Alum）；ピアス社] $100\mu l$ を腹腔内投与して感作し、その14日後に腹大静脈より血液を採取した。

採取した血液は遠心分離（2000rpm、5分）後、血漿を分離し、48時間ラット受身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応で抗原特異的IgE量を測定した。

すなわち血漿の倍々希釈系列を4倍から64倍まで、生理食塩水を用いて作製し、毛刈りした7週令のW i s t e r系雄性ラットの背部に皮内に0.1mlずつ注射した。皮内注射の48時間後、0.05%卵白アルブミン及び0.5%エバンスブルー（ナカライトスク社製）の混液1ml尾静脈より注射した。尾静脈注射30分後、ラットを断頭、放血死させ、背部に現れた青色スポットを観察し、直径5mm以上のスポットを陽性とし、最高希釈度をIgE力値として表した。

GM投与群は抗原感作日から3日間、3mg/kgあるいは30mg/kgのGMを1日1回腹腔内投与した。また対照群では蒸留水を同様に腹腔内投与した。その結果を表9に示す。

表 9

	IgE力値
対照群	64
GM 3mg/kg/日	32
GM 30mg/kg/日	8

卵白アルブミン感作による抗原特異的IgE量の上昇は用量依存的にGMの投与により抑制された。CM、GD、CD、またはこれらの各ジアステレオマー、GMの各ジアステレオマーについても同様のIgE産生抑制活性が認められた。

実施例 20

注射剤

(1) 生理食塩液（日本薬局方収載品）にCMを1%濃度で加え注射剤を作製した。

(2) 生理食塩水（前記と同じ）に、GM及びグリシルリチン酸をそれぞれ0.5%及び0.1%濃度で加え、注射剤を作製した。

実施例 21

錠剤

(1) CDの100mgと微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

(2) GDの0.1mg、グリシルリチン酸ジカリウム10mg及び微結晶セルロースの適量を含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

実施例 22

軟膏

GM	1 g
----	-----

吸水軟膏（日本薬局方収載）	99 g
---------------	------

GMをまず少量の吸水軟膏と十分に練り合せ、次いで残った吸水軟膏を徐々に加えて均一になるまで練り合せて軟膏を作製した。

この軟膏は1日4～5回患部に塗布される。

発明の効果

本発明により制がん作用、がん細胞増殖抑制作用、がん細胞分化誘導作用、アポトーシス誘発作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、肝機能改善作用、腫瘍壞死因子産生抑制作用、NO産生抑制作用、抗リウマチ作用等の種々の生理活性を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩が提供され、かつ、これらの化合物から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有する医薬が提供される。該医薬はこれらの化合物に感受性を示す疾患の治療剤又は予防剤として有用であり、特に生体防御剤、例えば抗アレルギー剤、抗リウマチ剤、糖尿病治療剤、制がん剤、抗病原微生物剤、例えば抗ウイルス剤、抗菌剤、免疫調節剤等として有用である。

また本発明により、食品又は飲料中に生理活性を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の適量を含有させることが可能となった。これらの化合物が有する種々の生理活性、制がん作用、分化誘導作用、異常細胞の増殖抑制作用、アポトーシス誘発作用、抗ウイルス作用、抗菌作用、肝機能改善作用、免疫調節作用等によって、本発明により提供される食品又は飲料は発がん予防効果、制がん効果、ウイルス性疾患予防効果、抗菌効果、アポトーシス誘発作

用等の生体の恒常性（ホメオスタシス）維持機能を有する健康食品又は飲料であり、本発明により、胃腸健康保持に有用な機能性物質入りの食品又は飲料が提供される。

請求の範囲

1. 下記一般式【I】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩。



(式中、5員環内の点線で示した結合子は、当該5員環が、二重結合を有するシクロペンテン環、或いはそれが飽和されたシクロペンタン環のいずれでもよいことを意味する。そして、シクロペンテン環の場合、XはOH、Yは=O、ZはHであり、他方シクロペンタン環の場合、Xは=O、YはOH、ZはOHである。またRはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

2. 下記一般式【II】で表される請求の範囲1記載の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩。



(但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

3. 下記一般式【III】で表される請求の範囲1記載の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩。

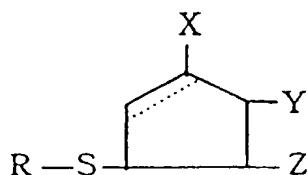


(但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

4. SH基含有化合物がSH基含有アミノ酸又はその誘導体である請求の範囲1～3のいずれか1項に記載の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩。

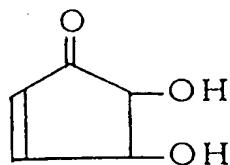
5. SH基含有化合物がシステイン又はグルタチオンである請求の範囲4に記載の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩。

6. 下記式【IV】で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物と、SH基含有化合物を反応させることを特徴とする下記一般式【I】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の製造方法。



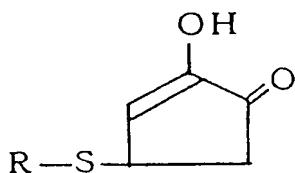
【I】

(式中、5員環内の点線で示した結合子は、当該5員環が、二重結合を有するシクロペンテン環、或いはそれが飽和されたシクロペンタン環のいずれでもよいことを意味する。そして、シクロペンテン環の場合、XはOH、Yは=O、ZはHであり、他方シクロペンタン環の場合、Xは=O、YはOH、ZはOHである。またRはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)



【IV】

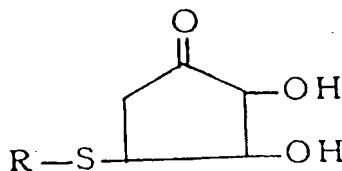
7. 一般式【I】で表される化合物が下記一般式【II】で表される化合物である請求の範囲6記載の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の製造方法。



【II】

(但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

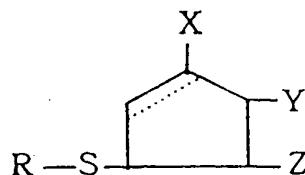
8. 酸性下で反応させることを特徴とする請求の範囲7記載の製造方法。
9. 一般式【I】で表される化合物が下記一般式【III】で表される化合物である請求の範囲6記載の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の製造方法



【III】

(但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

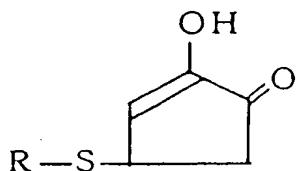
10. 中性下で反応させることを特徴とする請求の範囲9記載の製造方法。
11. SH基含有化合物がSH基含有アミノ酸又はその誘導体である請求の範囲6～10のいずれか1項に記載の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の製造方法。
12. SH基含有化合物がシステイン又はグルタチオンである請求の範囲11に記載の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の製造方法。
13. 下記一般式【I】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として含有することを特徴とする医薬。



【I】

(式中、5員環内の点線で示した結合子は、当該5員環が、二重結合を有するシクロペンテン環、或いはそれが飽和されたシクロペンタン環のいずれでもよいことを意味する。そして、シクロペンテン環の場合、XはOH、Yは=O、ZはHであり、他方シクロペンタン環の場合、Xは=O、YはOH、ZはOHである。またRはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

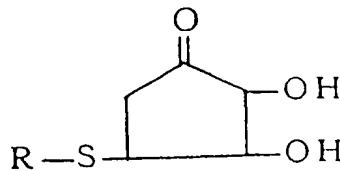
14. 下記一般式【II】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として含有することを特徴とする請求の範囲13記載の医薬。



【II】

(但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

15. 下記一般式【III】で表される化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として含有することを特徴とする請求の範囲13記載の医薬。

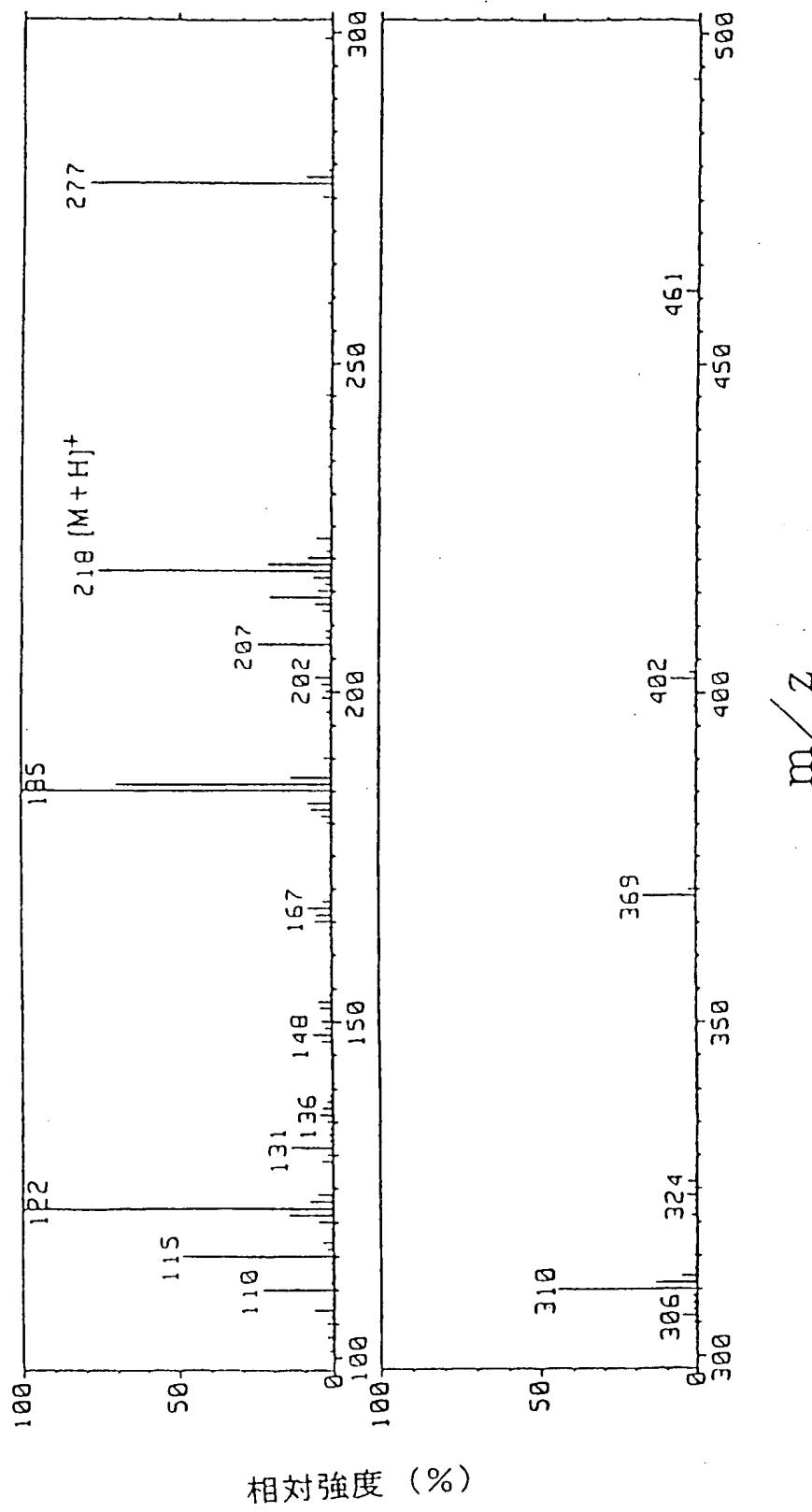


【III】

(但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である)

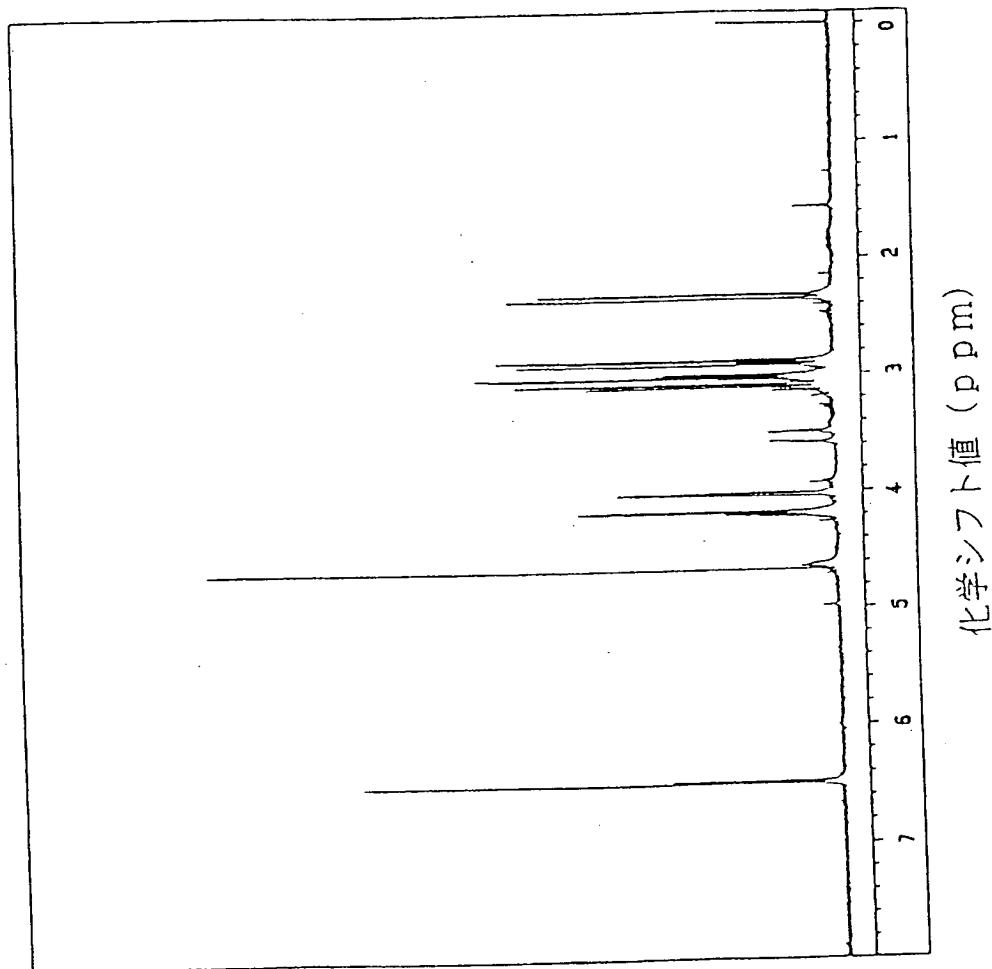
16. SH基含有化合物がSH基含有アミノ酸又はその誘導体である請求の範囲13～15のいずれか1項に記載の医薬。
17. SH基含有化合物がシステイン又はグルタチオンである請求の範囲16に記載の医薬。
18. 医薬が生体防御剤である請求の範囲13～17のいずれか1項に記載の医薬。
19. 生体防御剤が抗アレルギー剤である請求の範囲18記載の医薬。
20. 生体防御剤が抗リウマチ剤である請求の範囲18記載の医薬。
21. 医薬が糖尿病治療剤である請求の範囲13～17のいずれか1項に記載の医薬。
22. 医薬が制がん剤である請求の範囲13～17のいずれか1項に記載の医薬。
23. 医薬がアポトーシス誘発剤である請求の範囲13～17のいずれか1項に記載の医薬。
24. 医薬が抗病原微生物剤である請求の範囲13～17のいずれか1項に記載の医薬。
25. 抗病原微生物剤が抗菌剤である請求の範囲24記載の医薬。
26. 抗病原微生物剤が抗ウイルス剤である請求の範囲24記載の医薬。
27. ウィルスがヒト後天性免疫不全ウィルス、又はC型肝炎ウィルスである請求の範囲26記載の医薬。
28. 抗ウイルス剤がヒト用抗ウイルス剤、非ヒト動物用抗ウイルス剤又は植物用抗ウイルス剤である請求の範囲26記載の医薬。

図 1



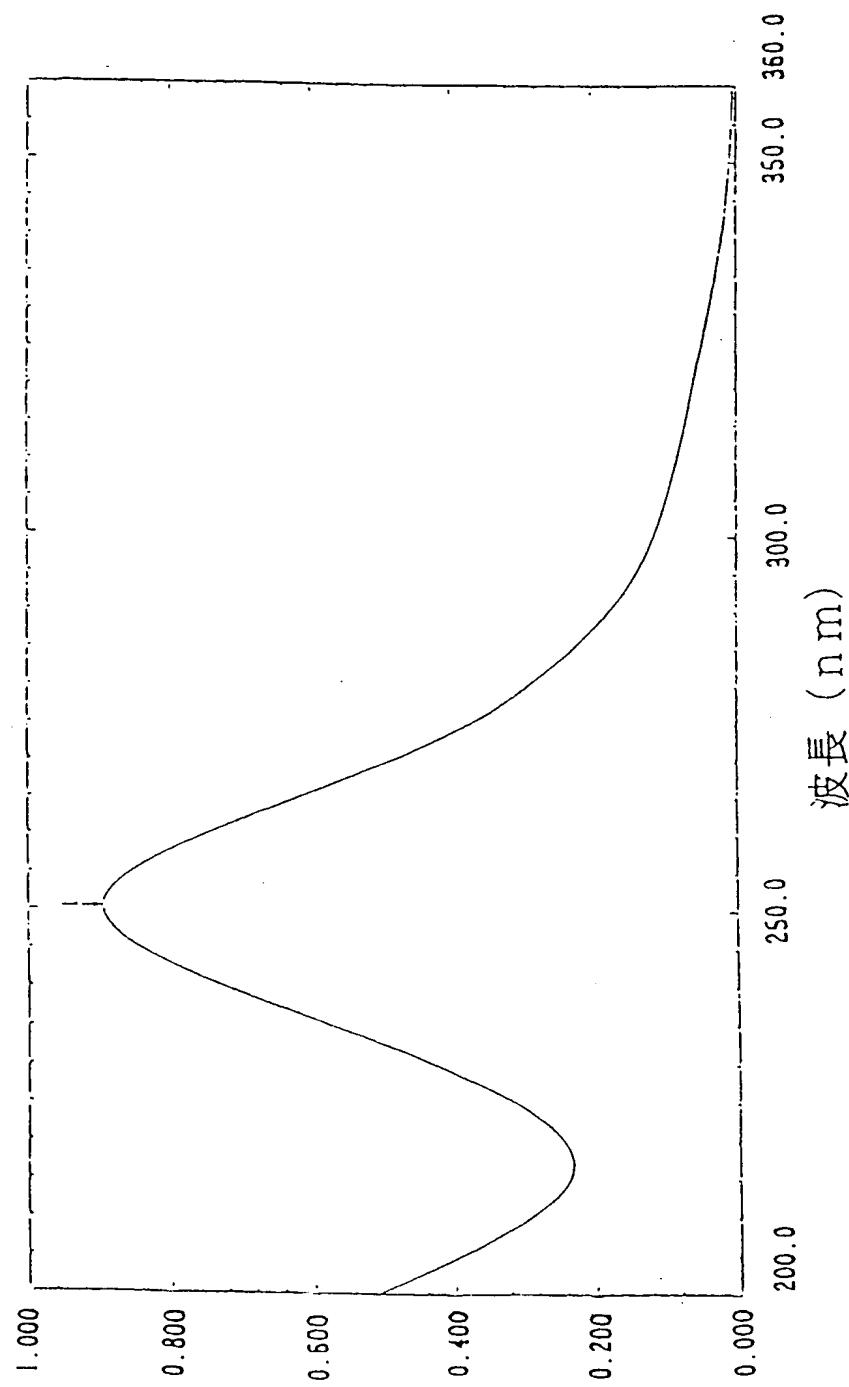
相対強度 (%)

図 2



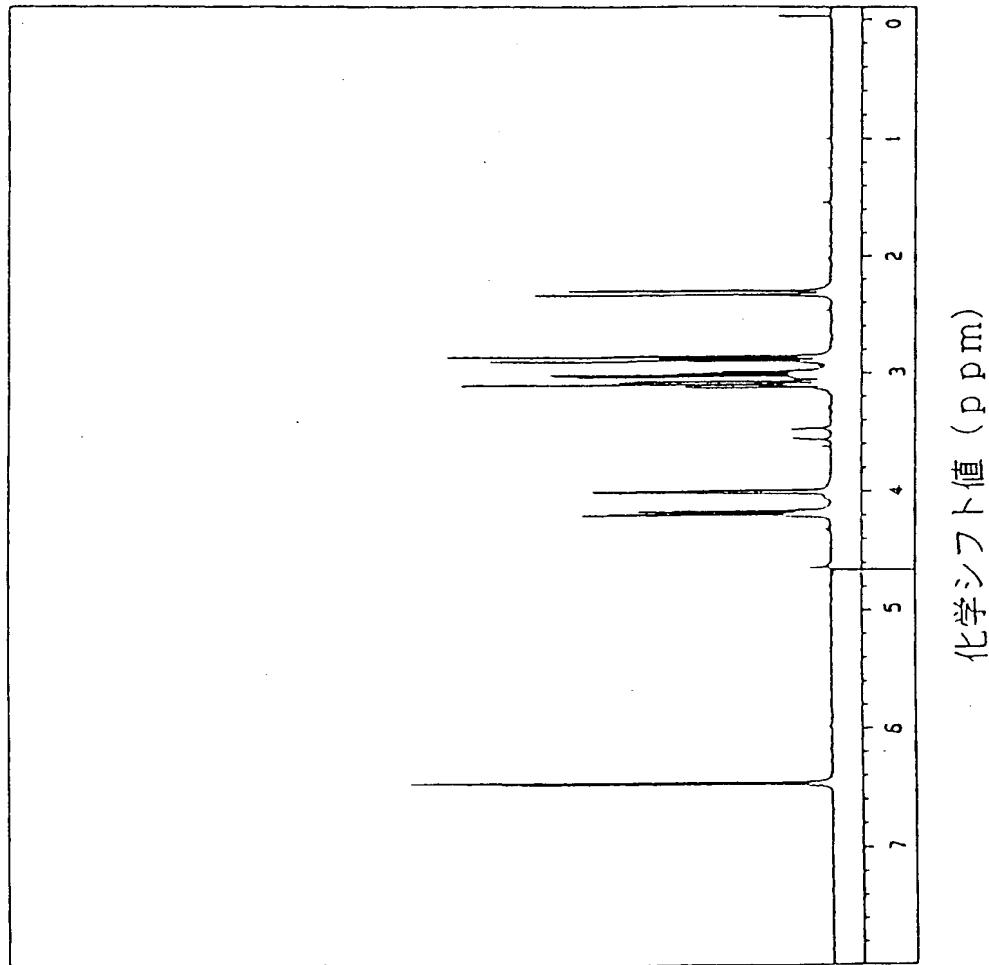
シグナルの強度

図 3



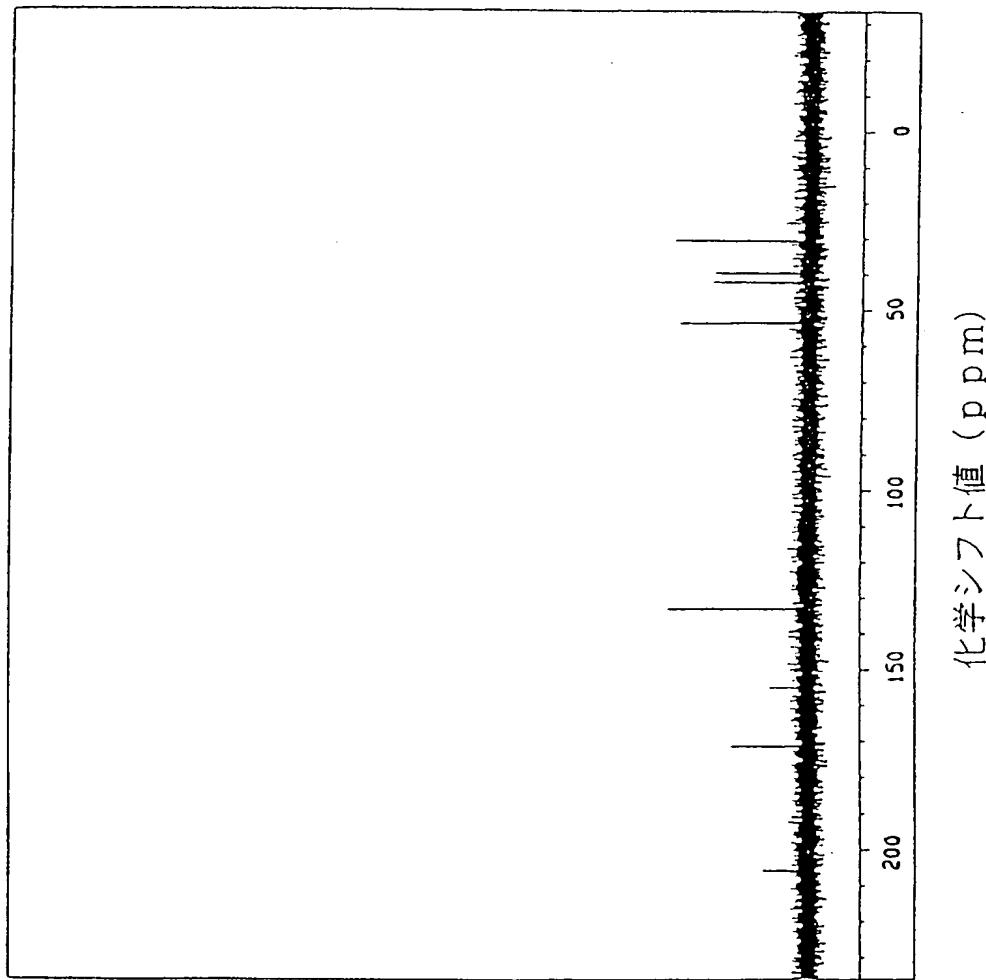
吸光度

図 4



シグナルの強度

図 5



シグナルの強度

図 6

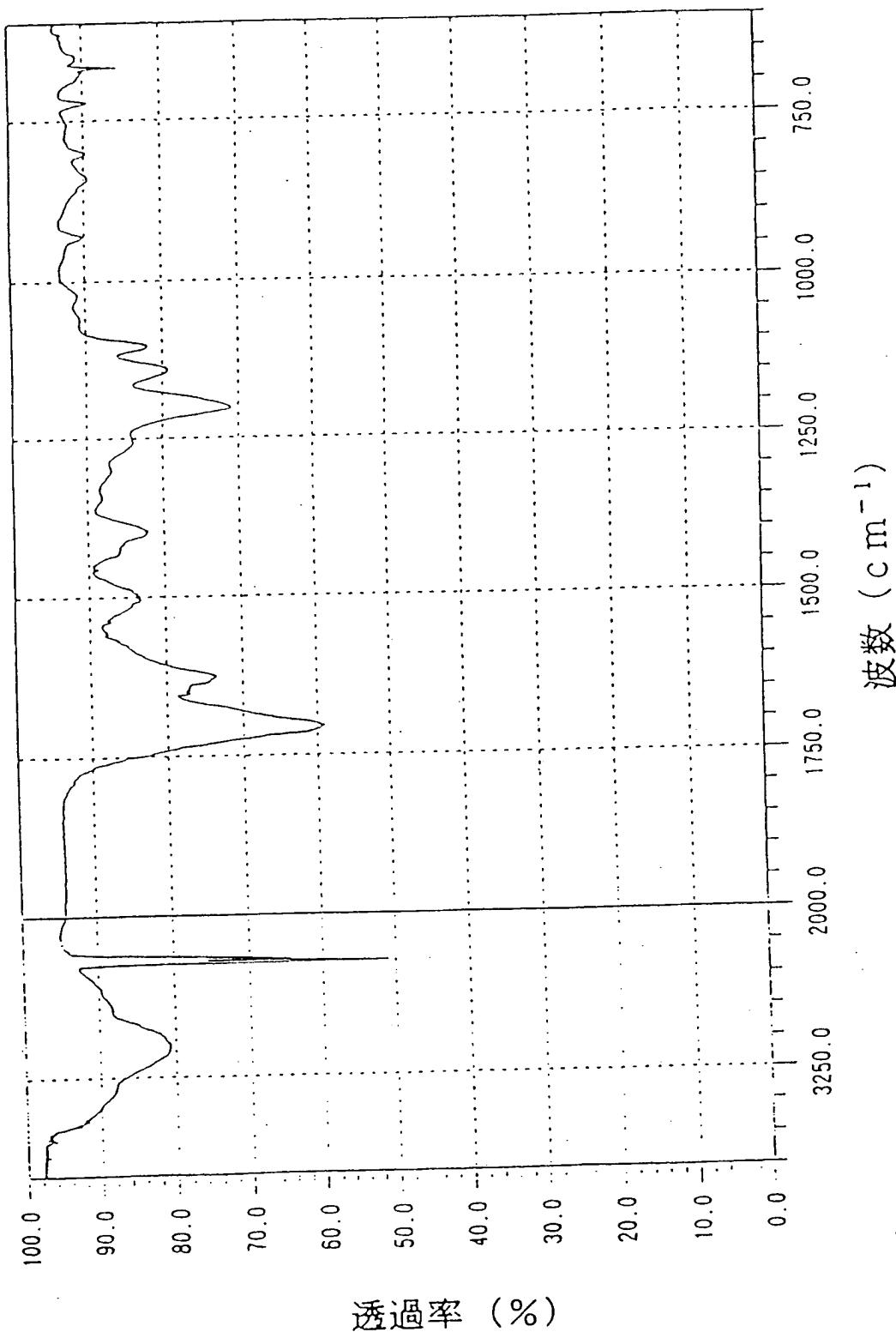


図 7

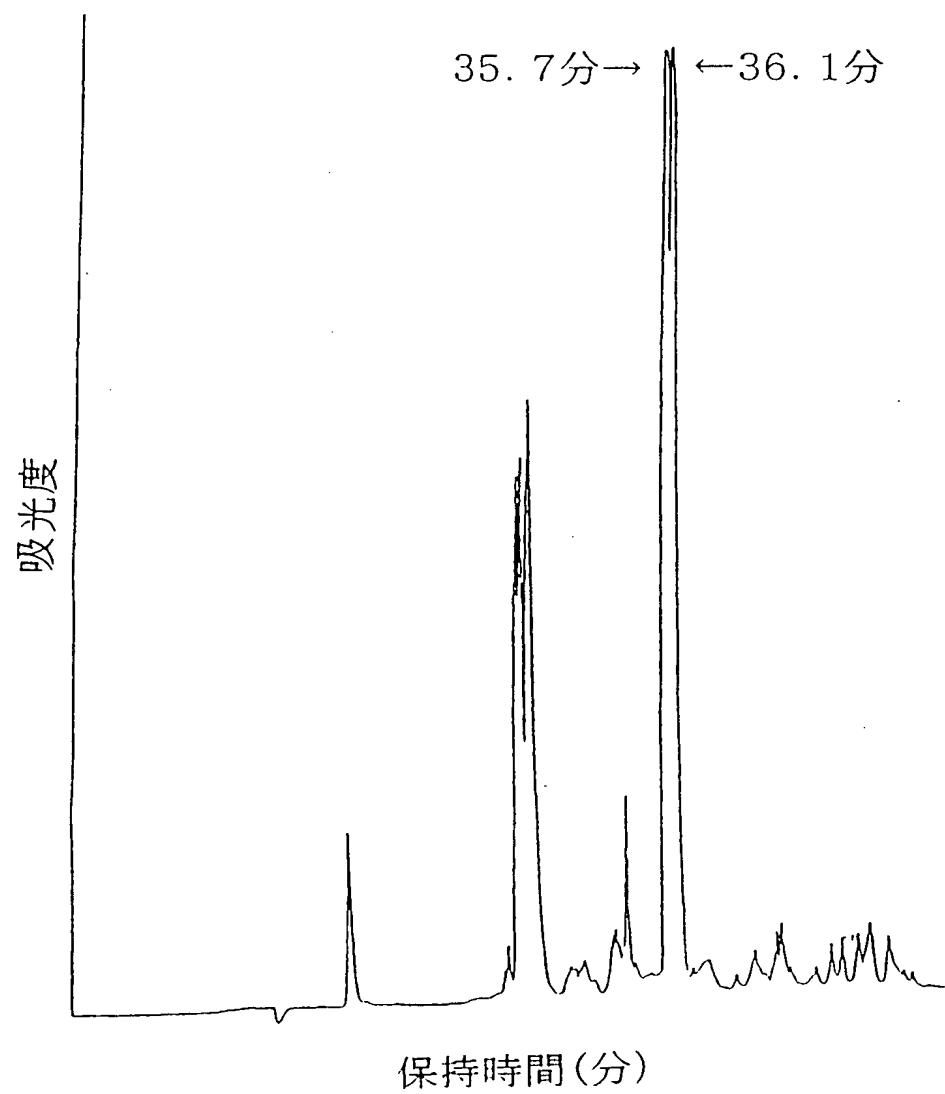
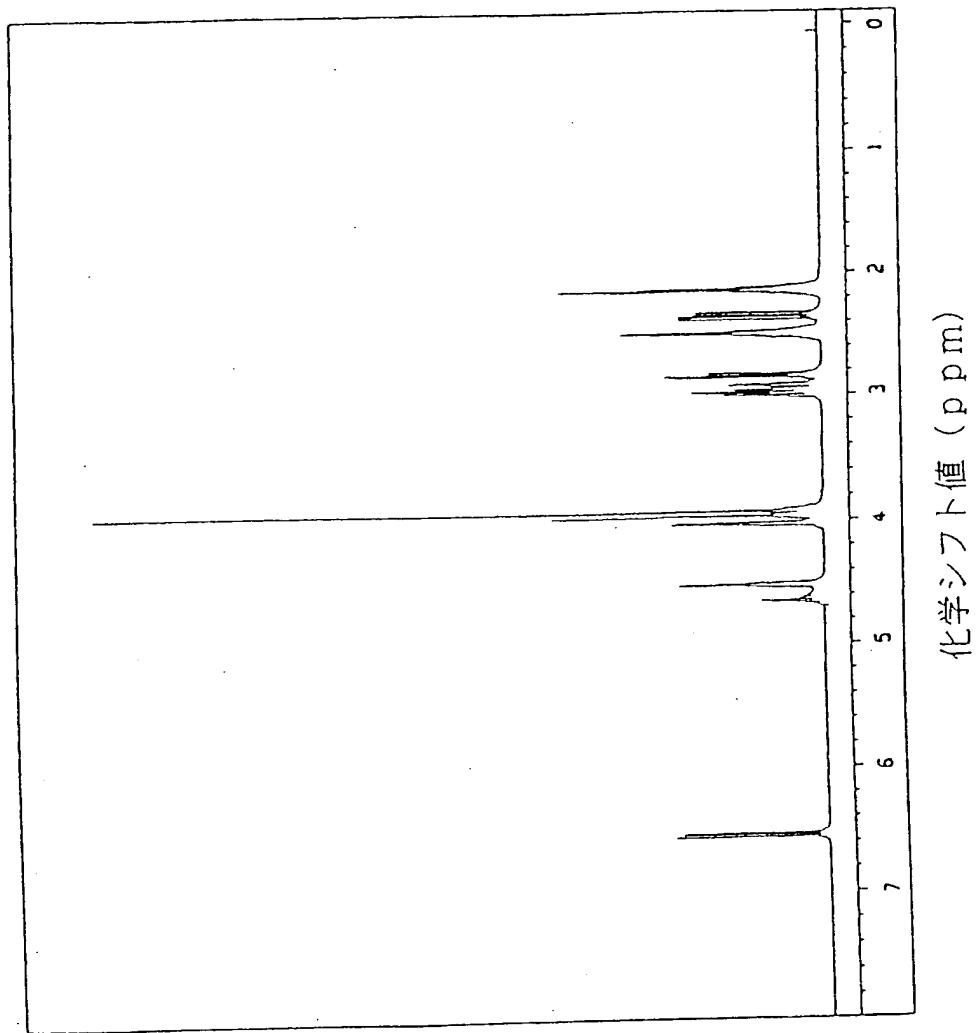
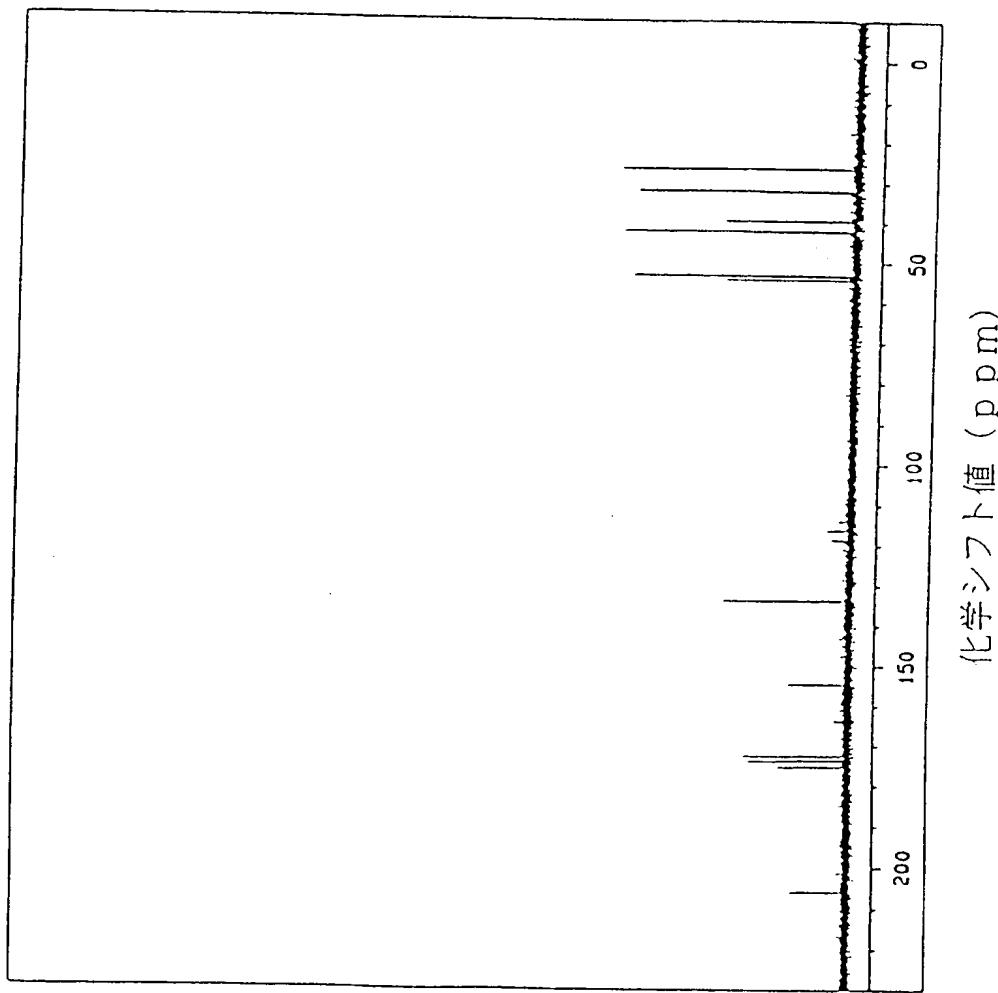


図 8



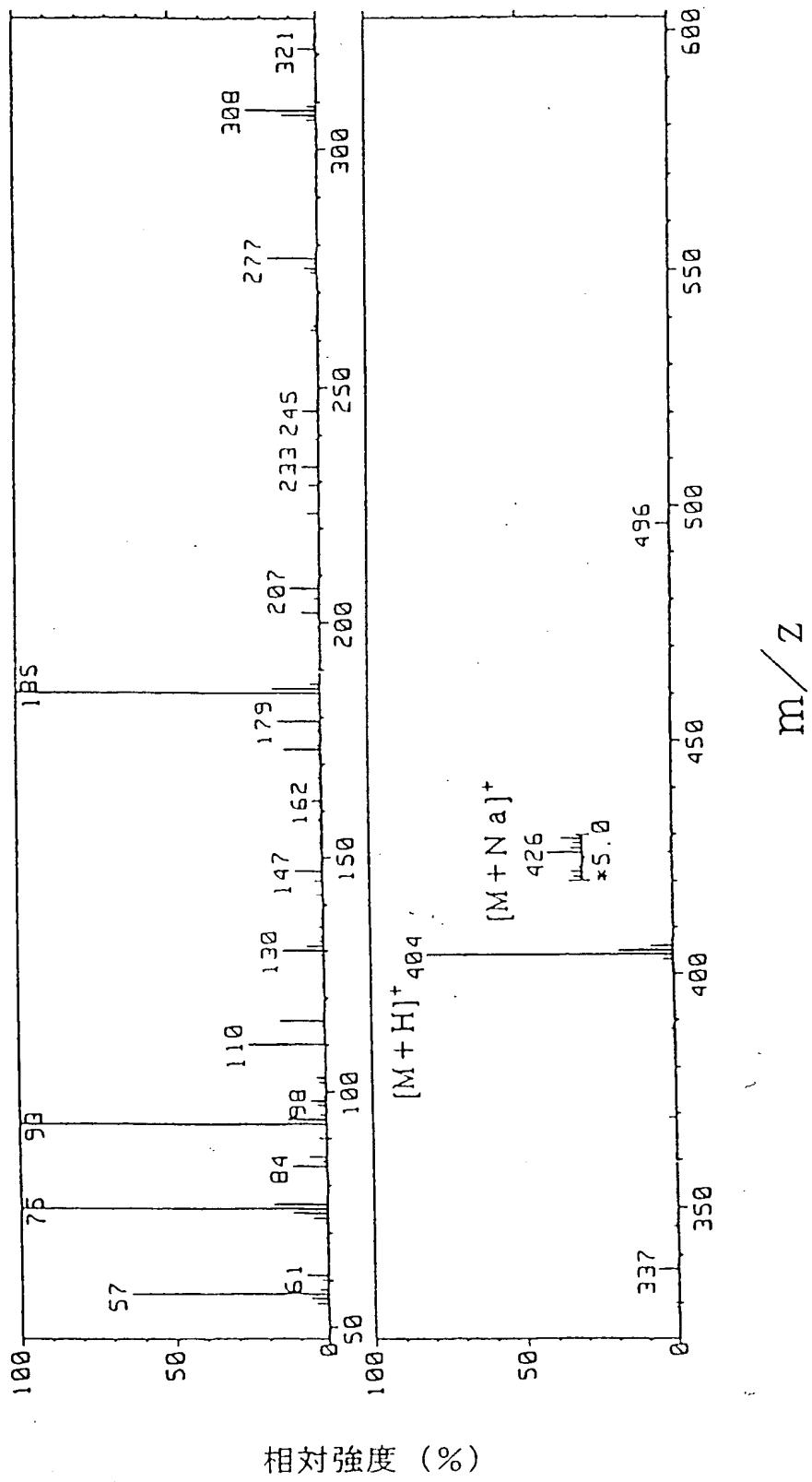
シグナルの強度

図 9



シグナルの強度

图 1 O



相对强度 (%)

図 1 1

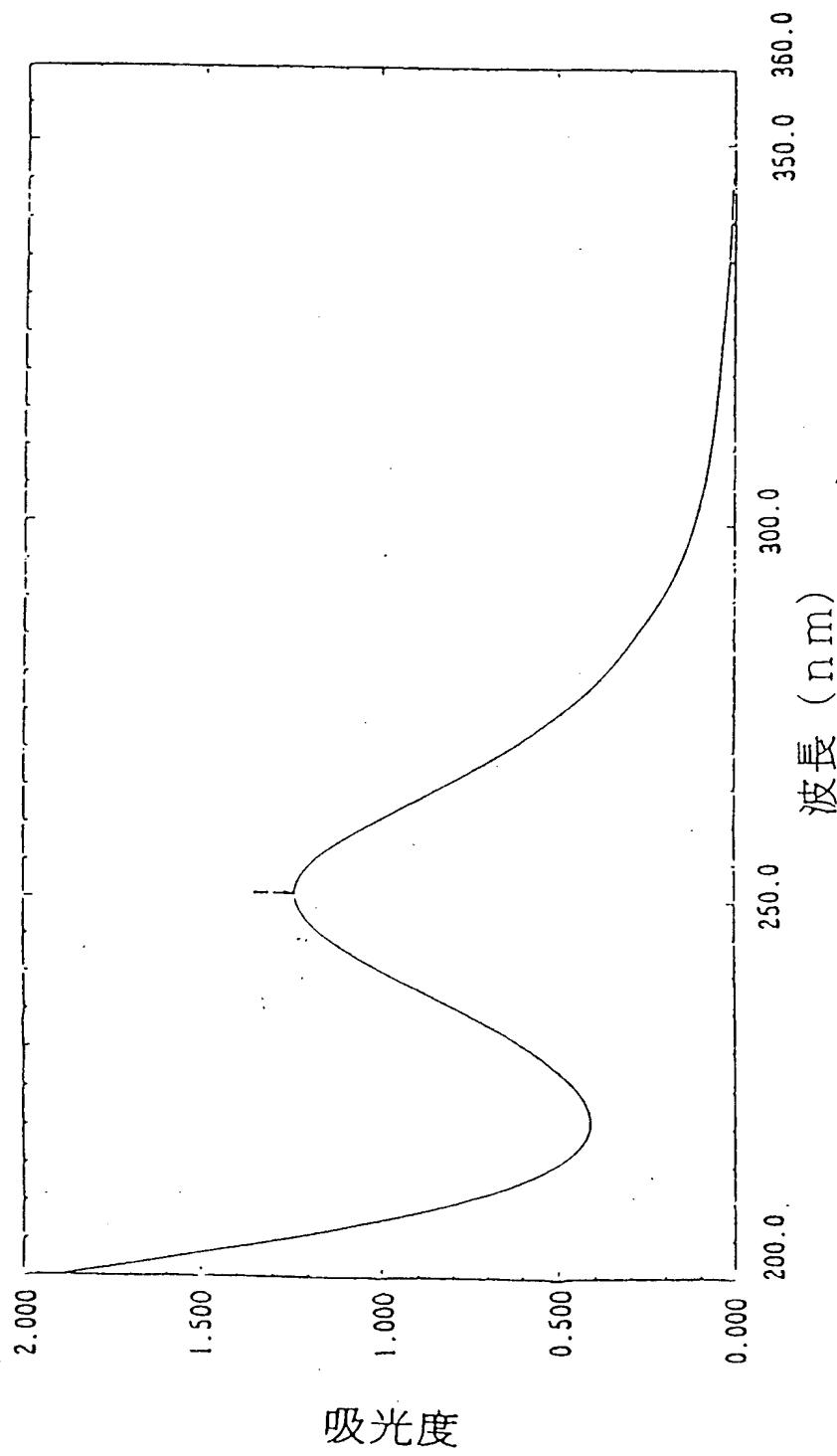


図 12

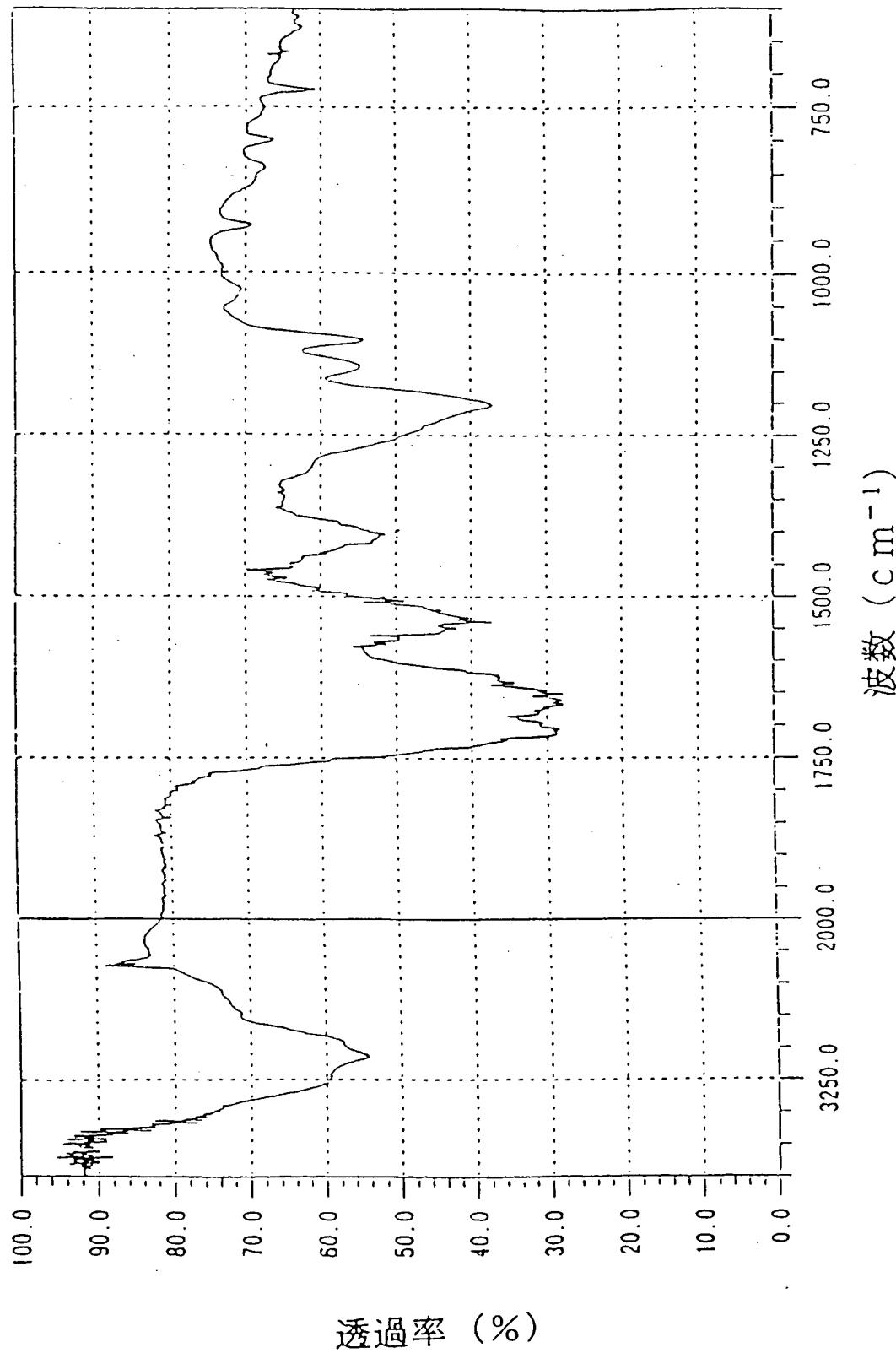


図 1 3

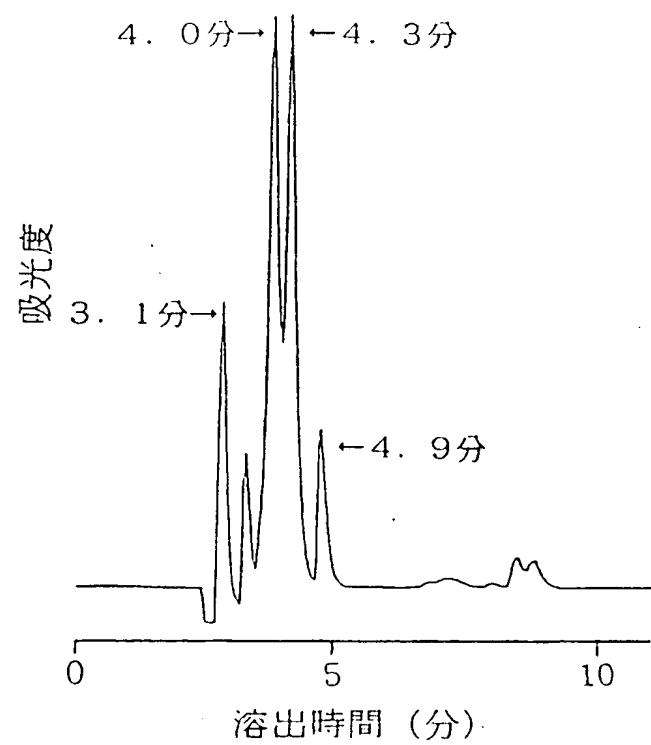


图 1 4

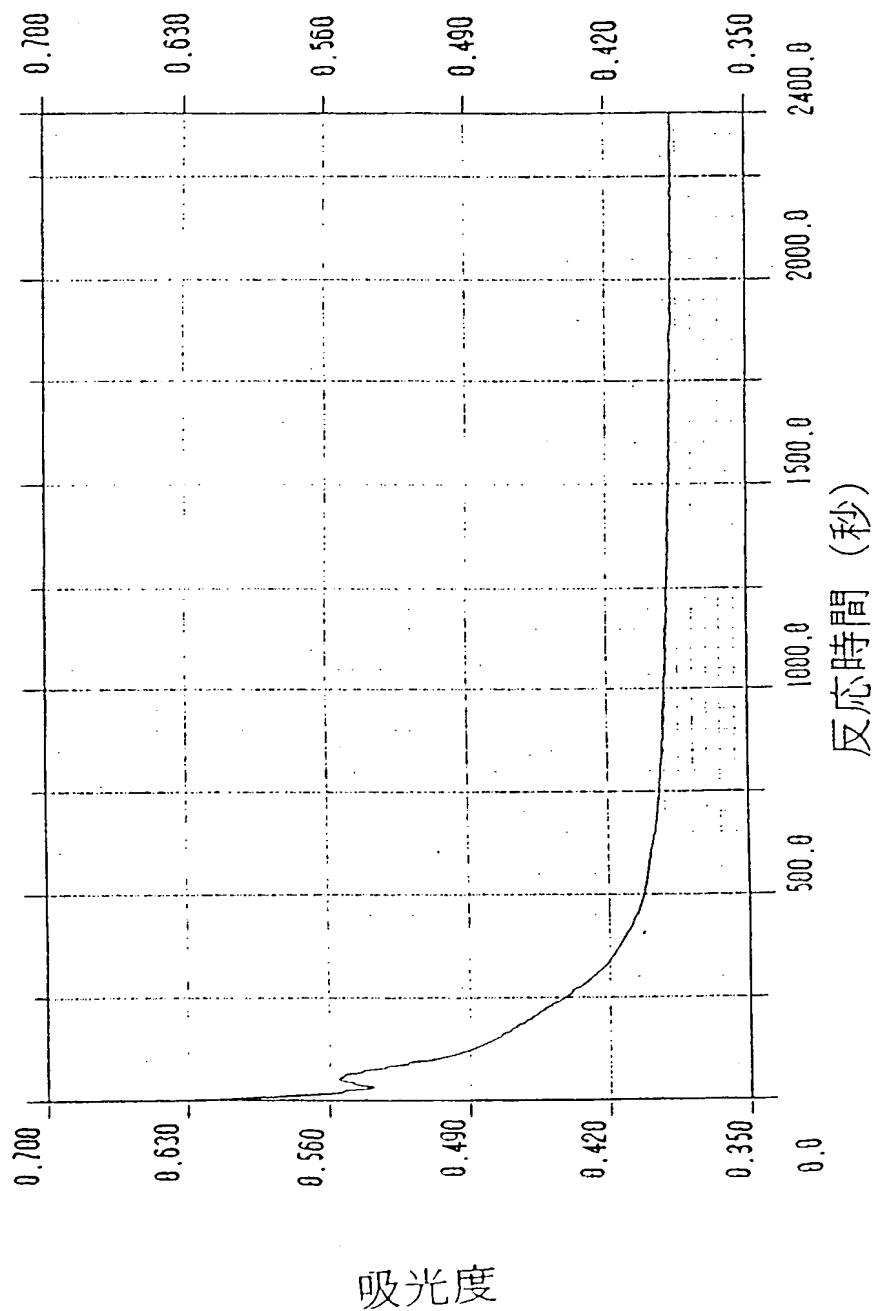


図 1 5

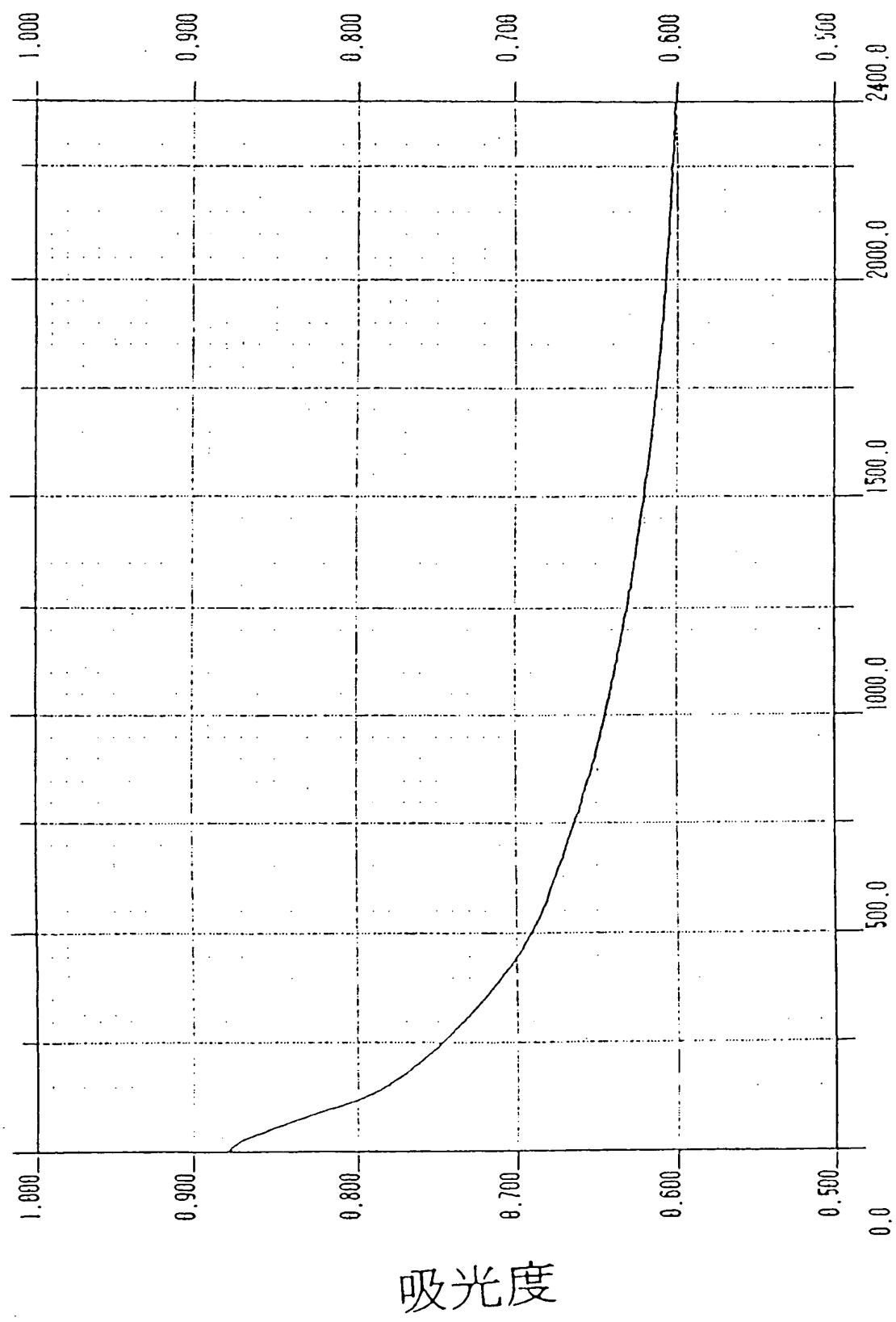
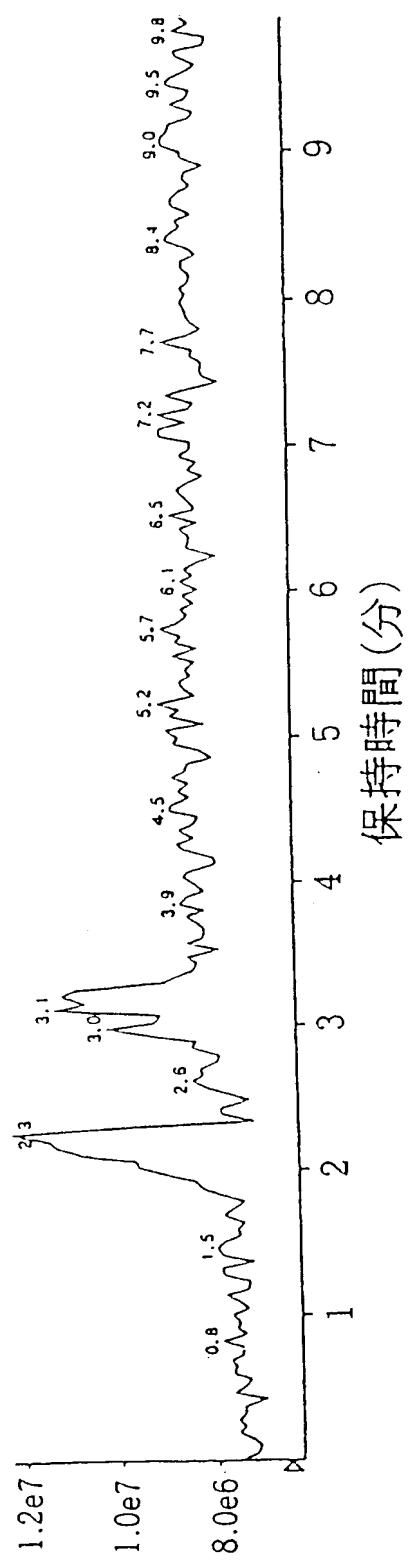


図 1 6



全イオン強度(相対値)

図 1 7

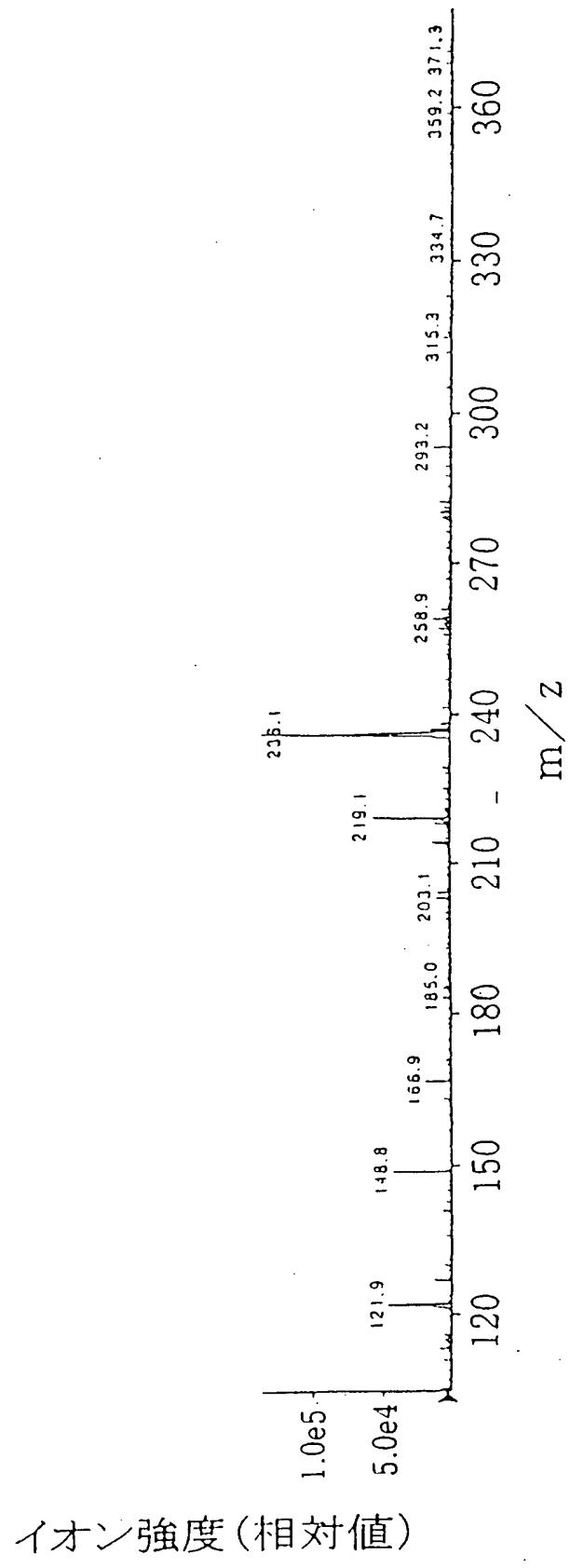


図 1 8

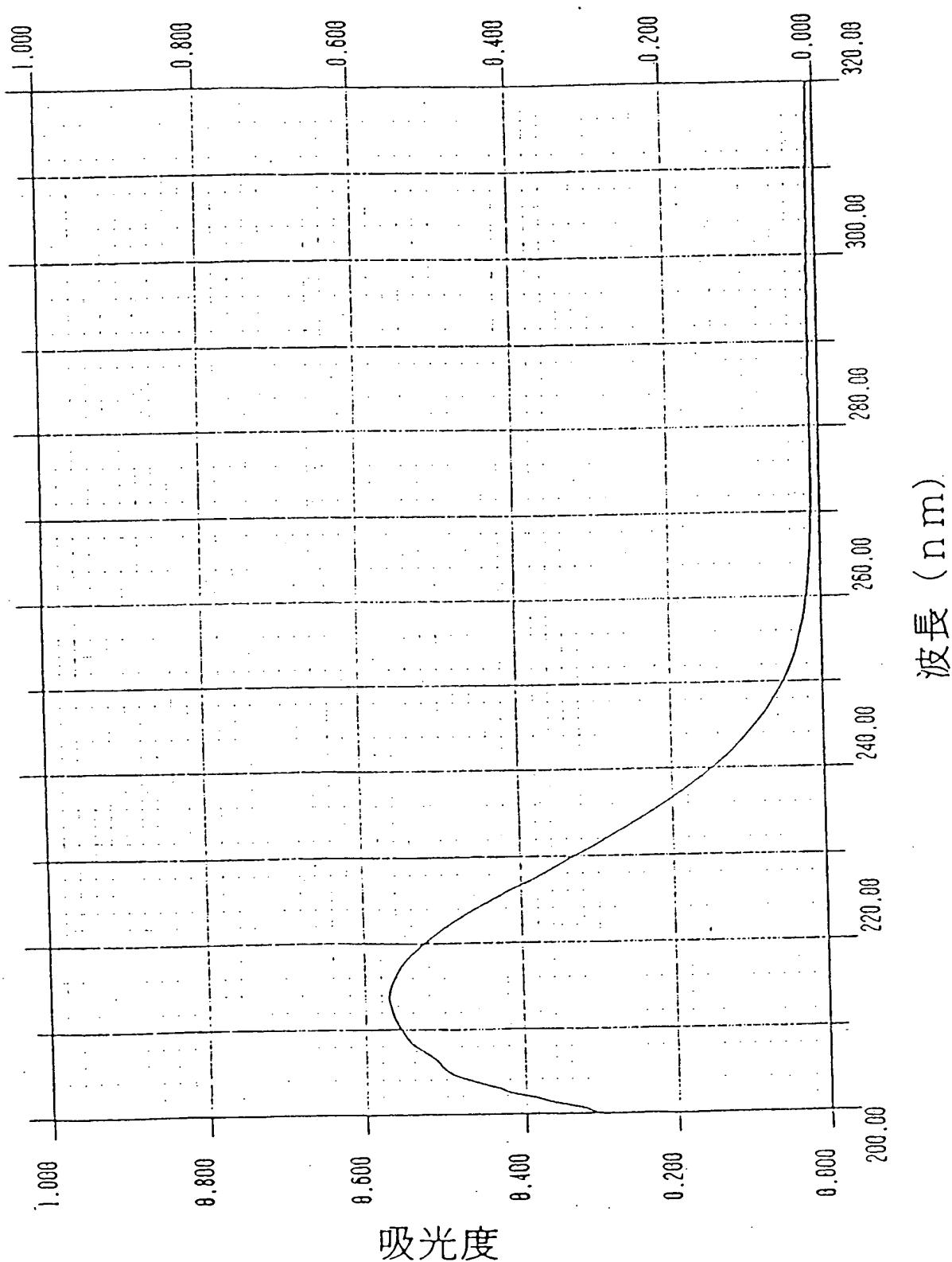


図 1 ⑨

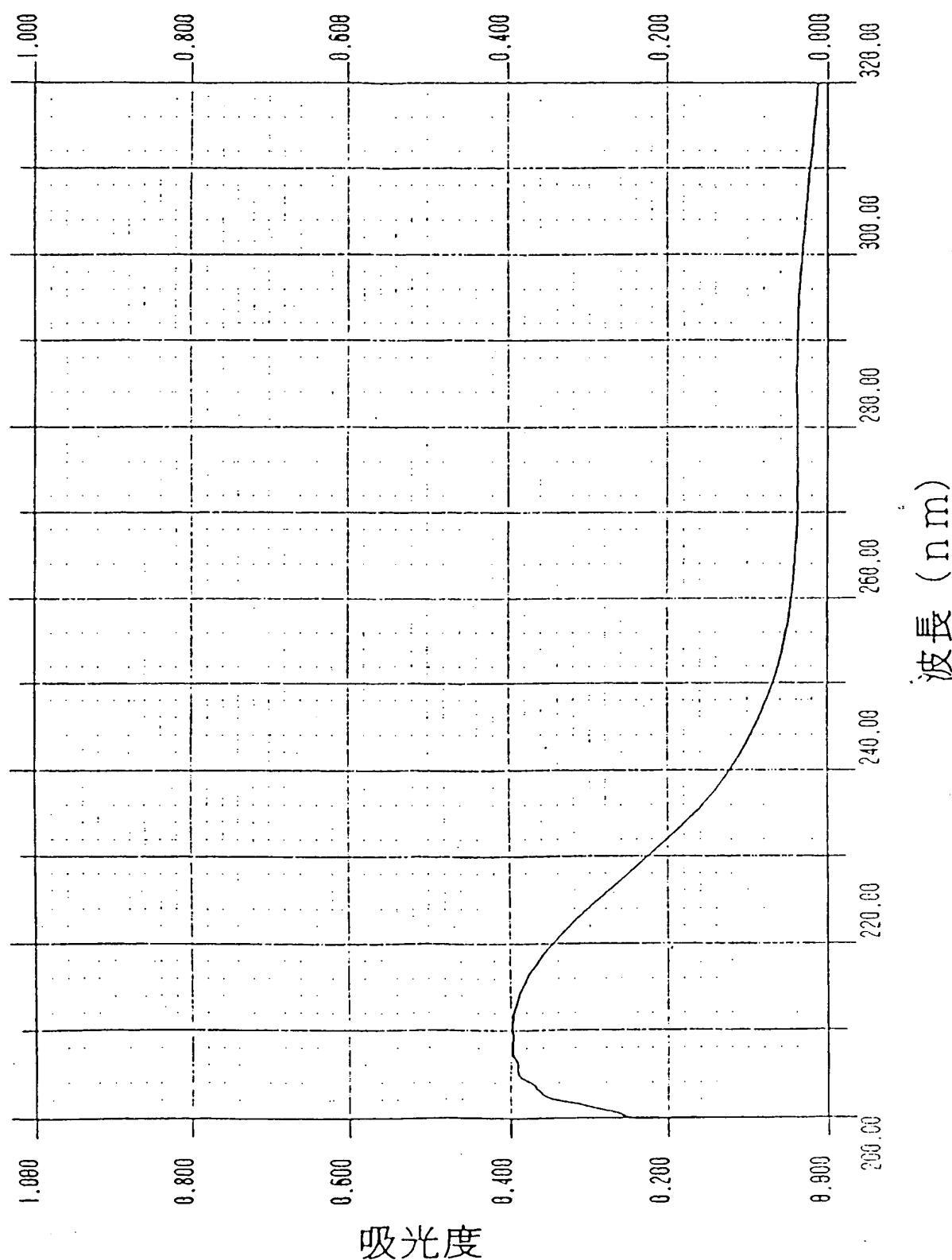
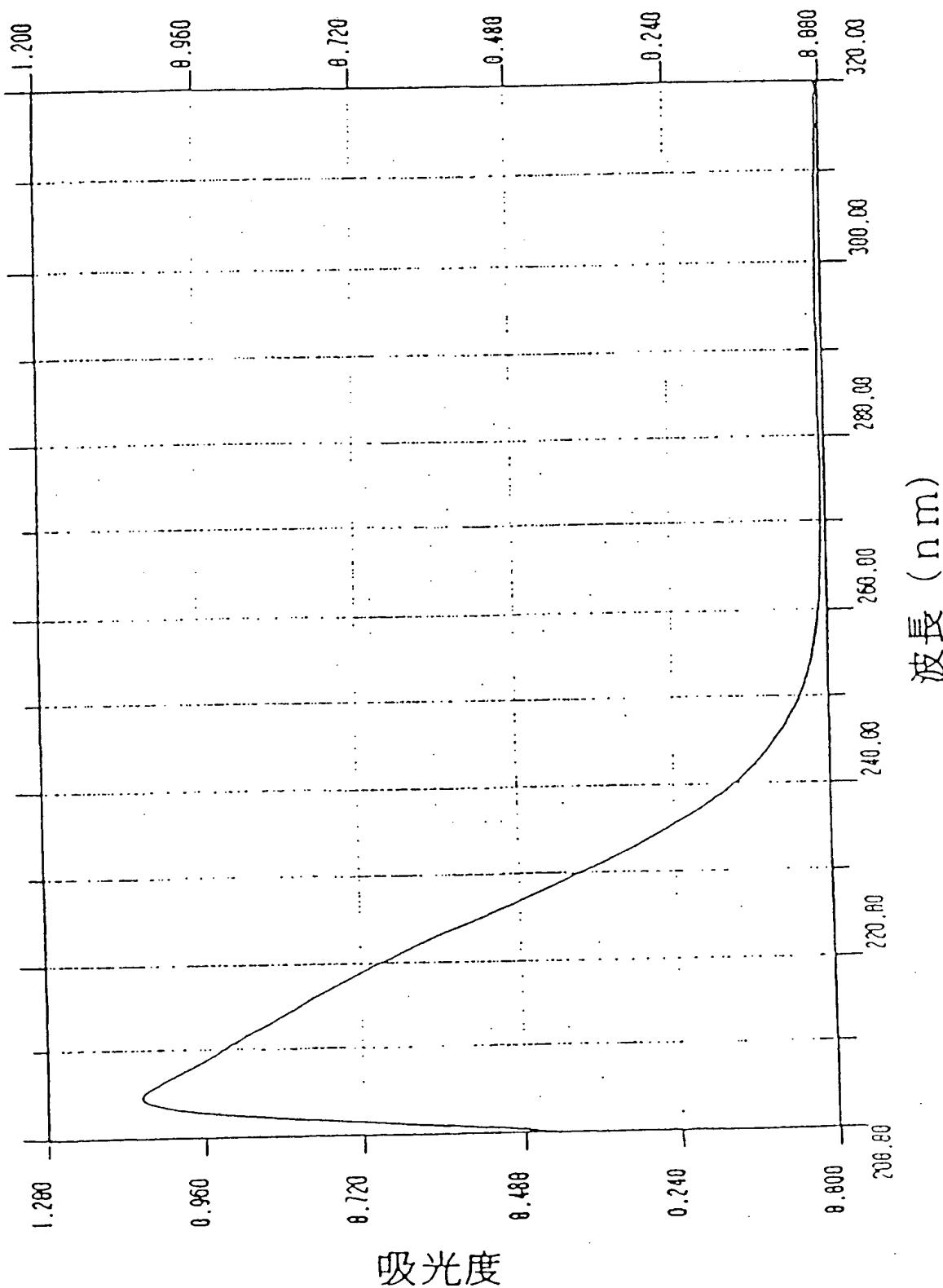


図 2 O



吸光度

図 2 1

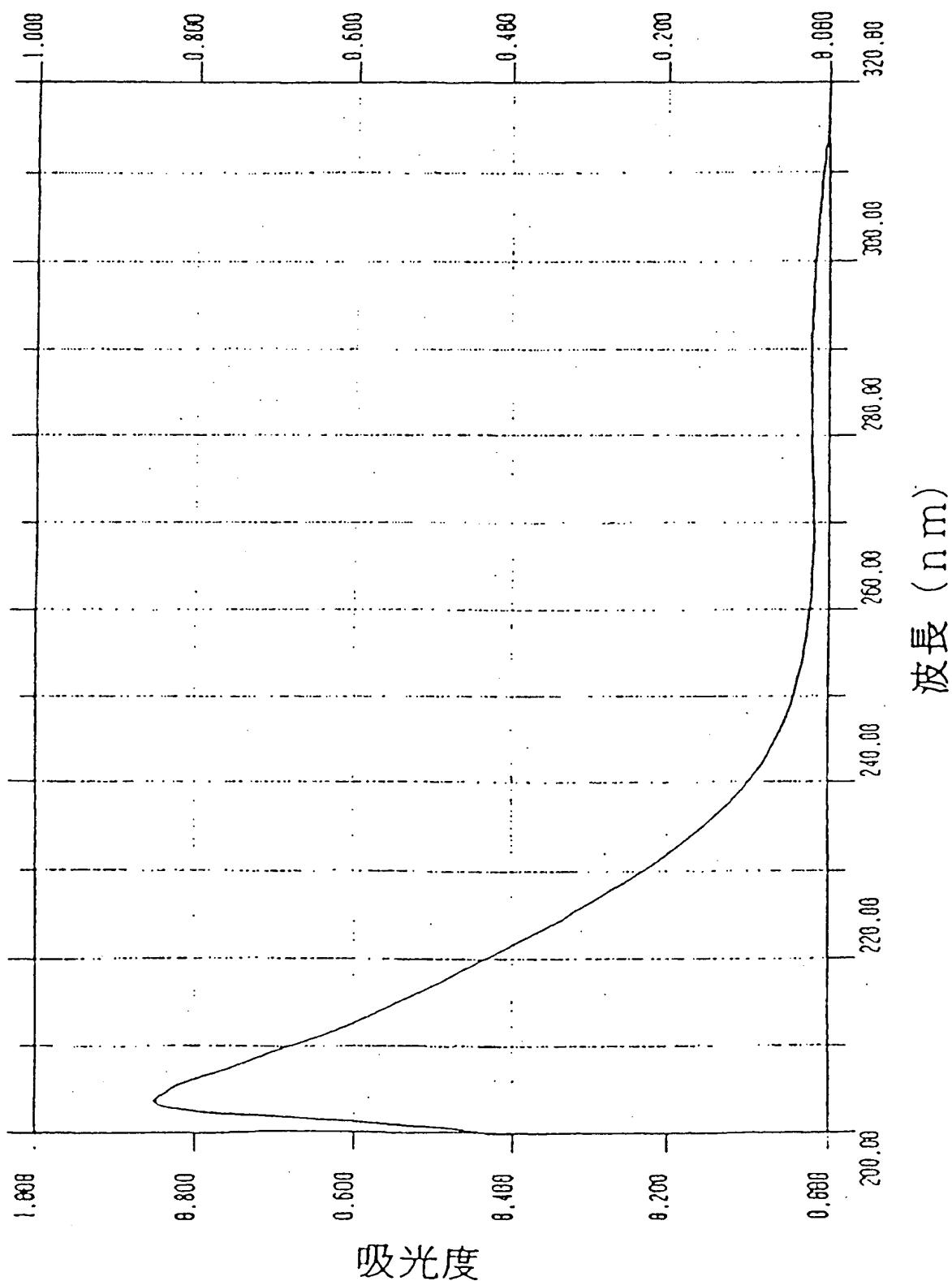


図 2 2

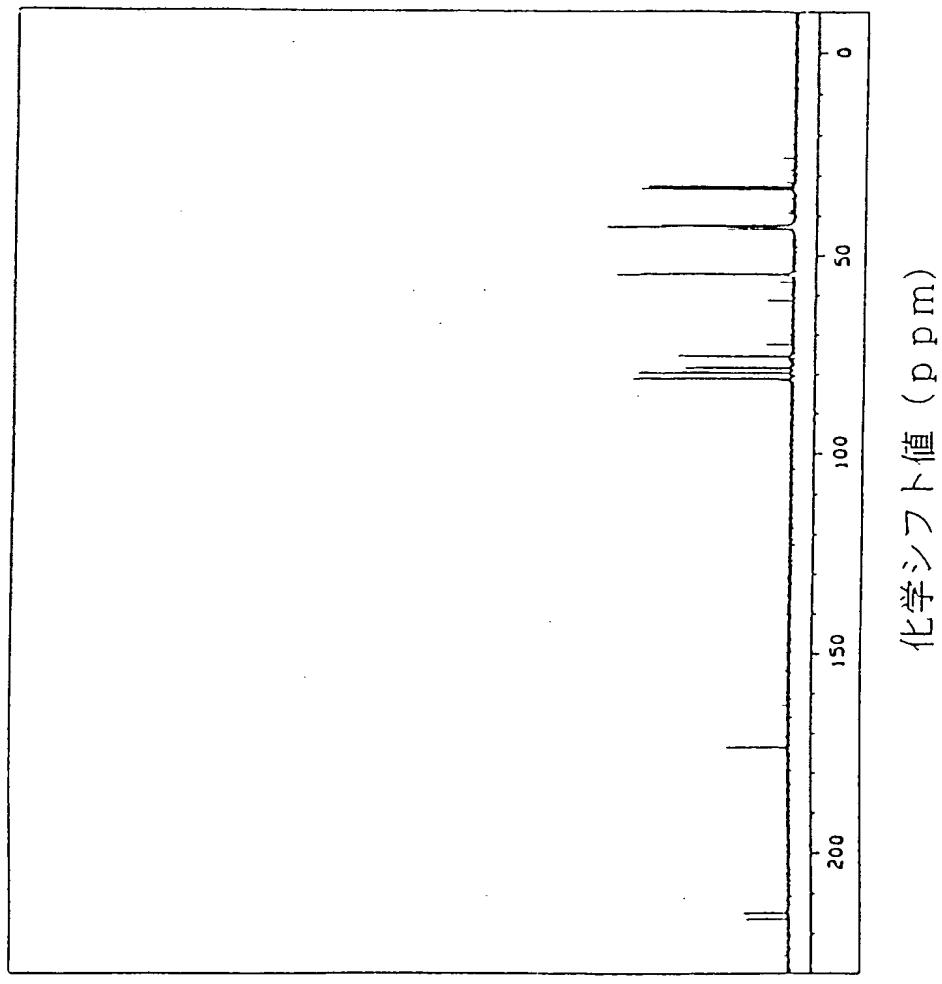


図 2 3

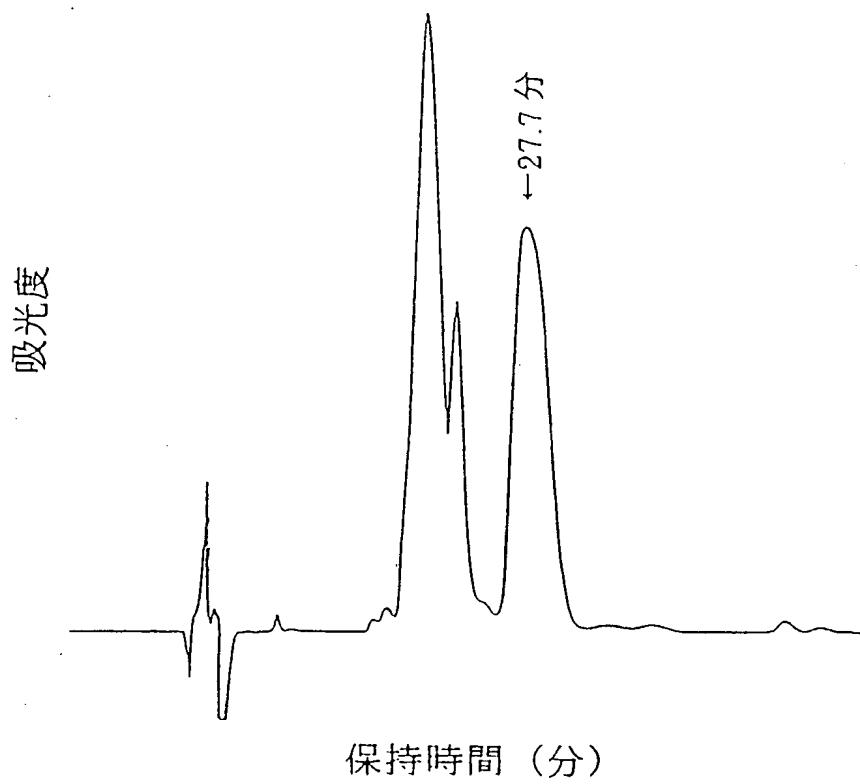
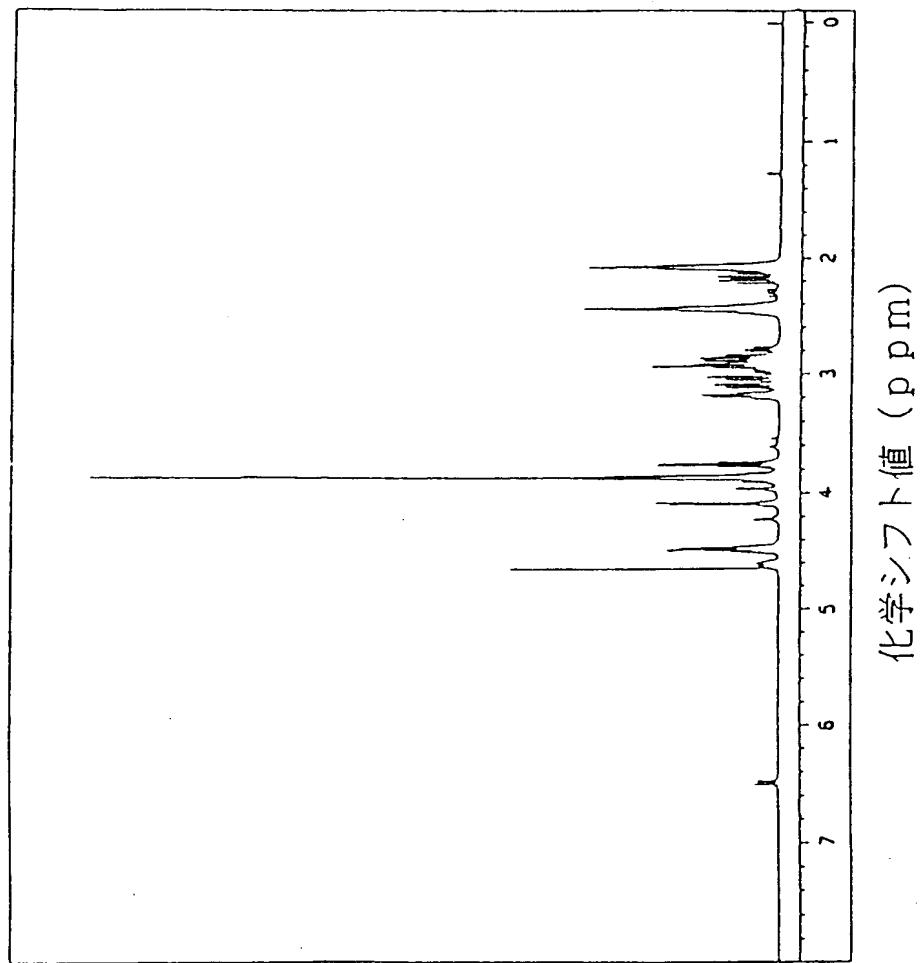
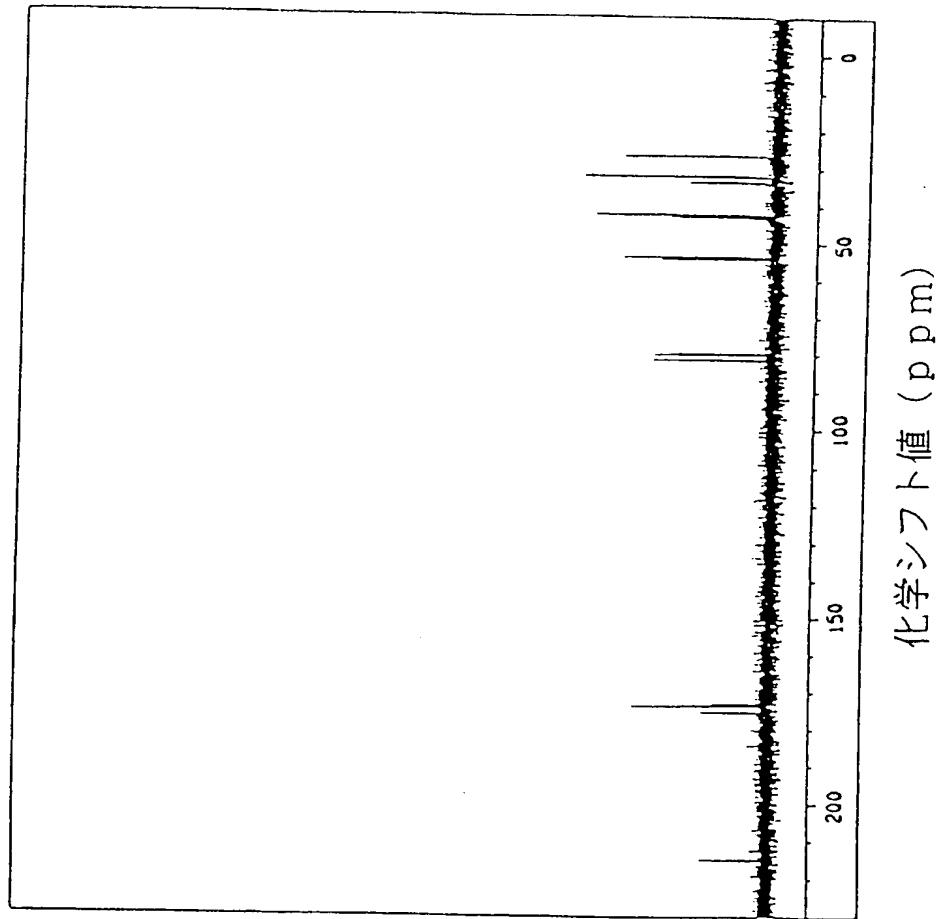


図 2-4

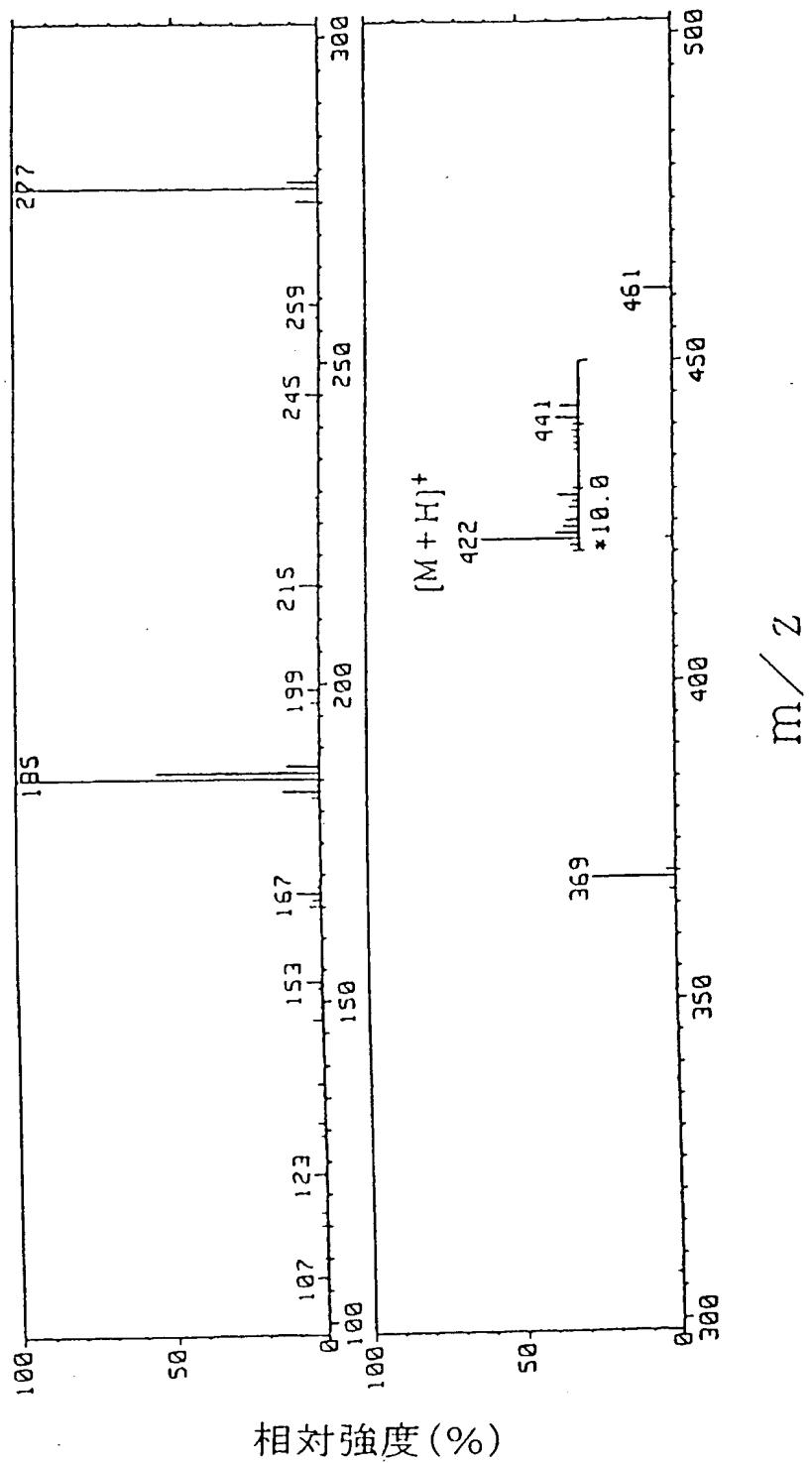


シグナルの強度

図 2 5



☒ 2 6



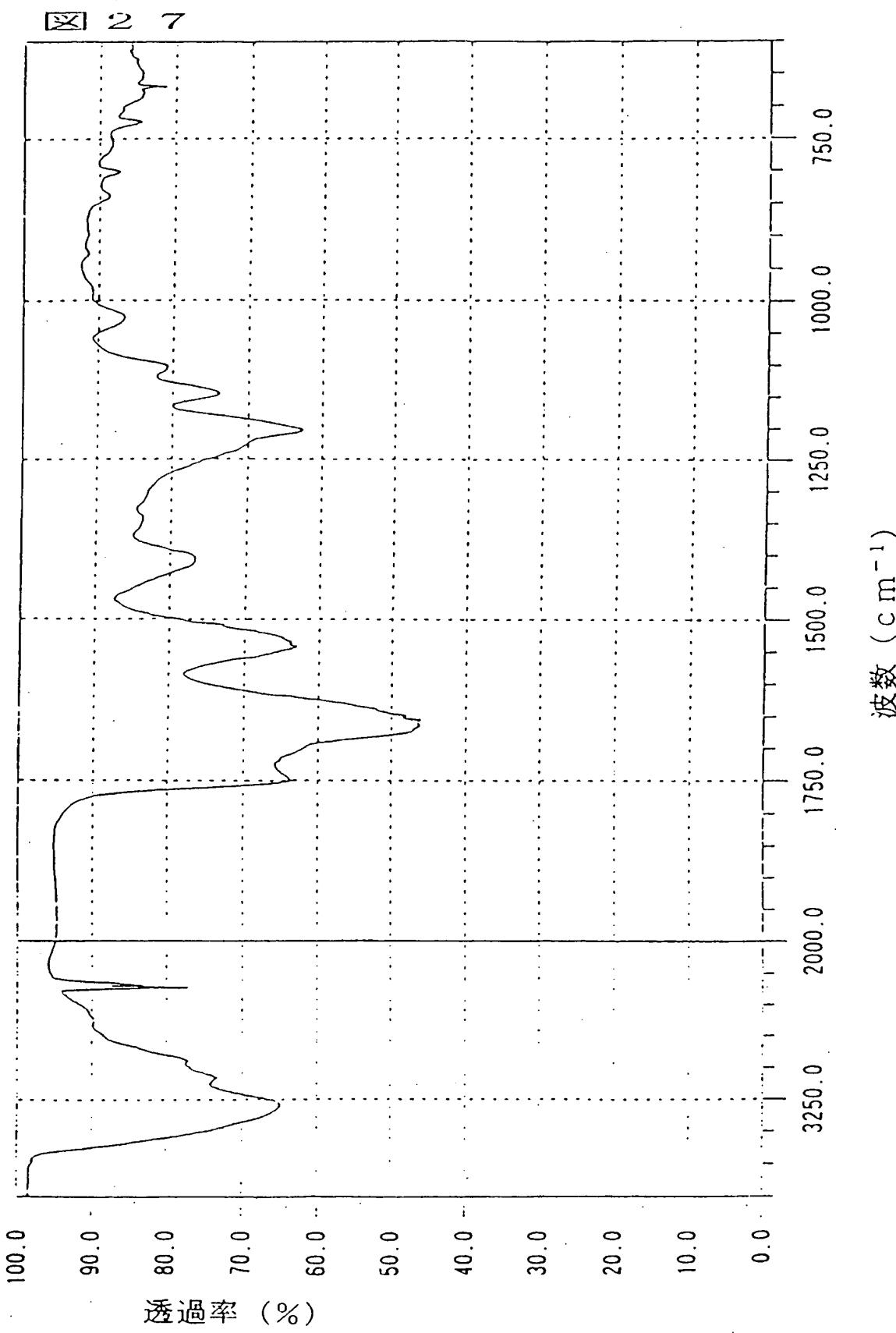


図 2 8

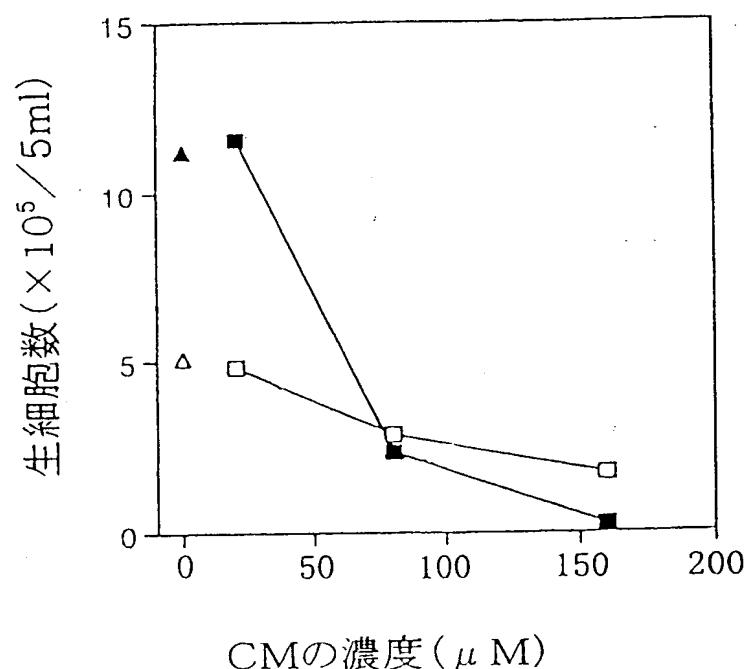


図 2 9

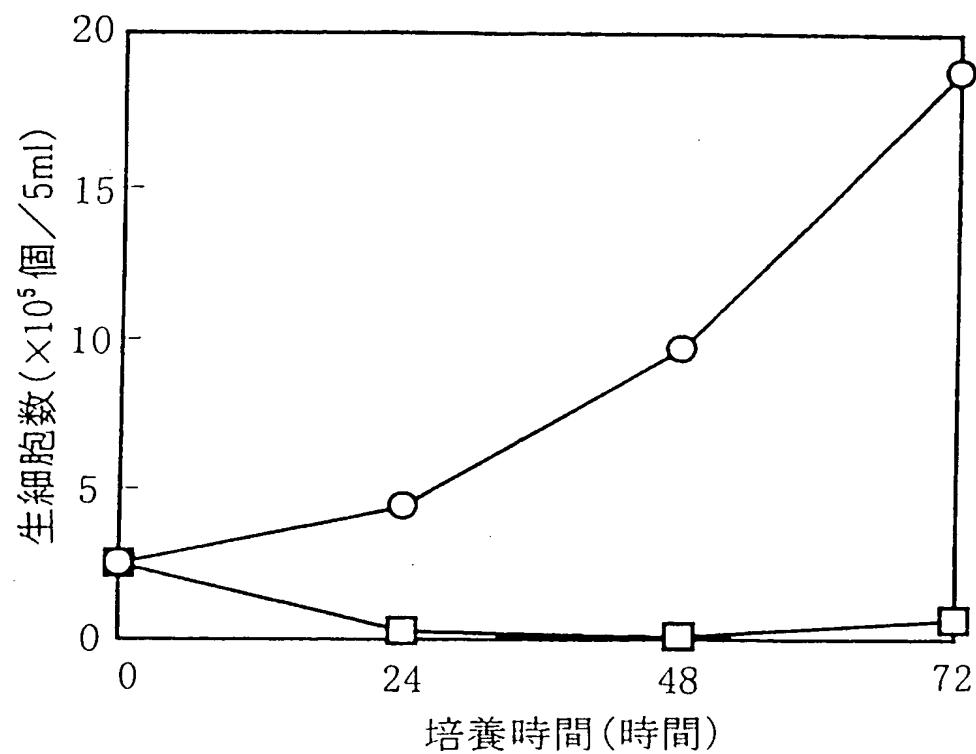


図 3 O

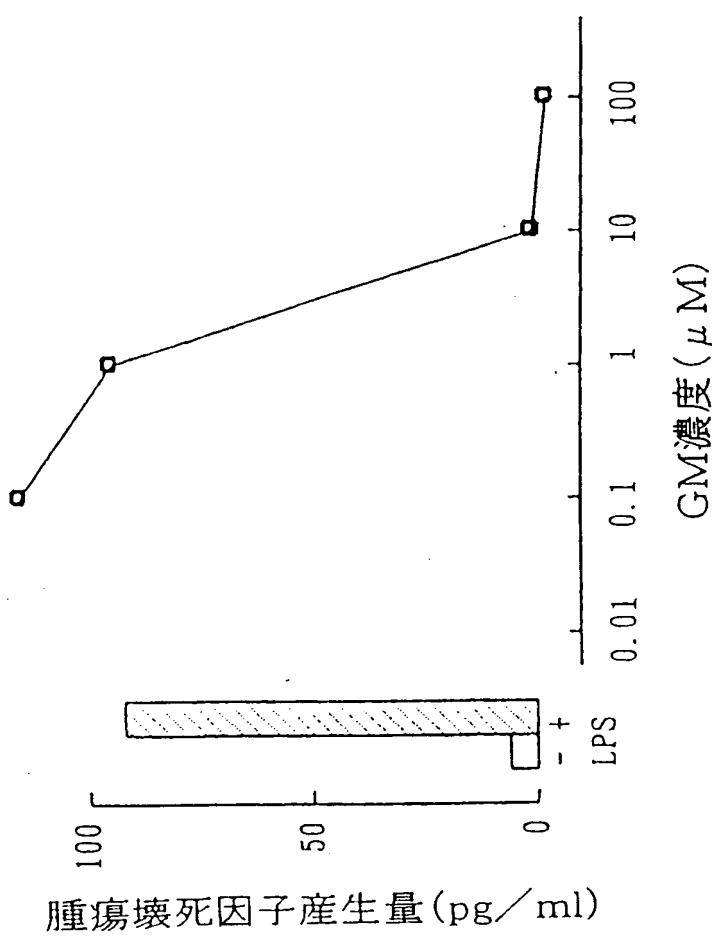


図 3 1

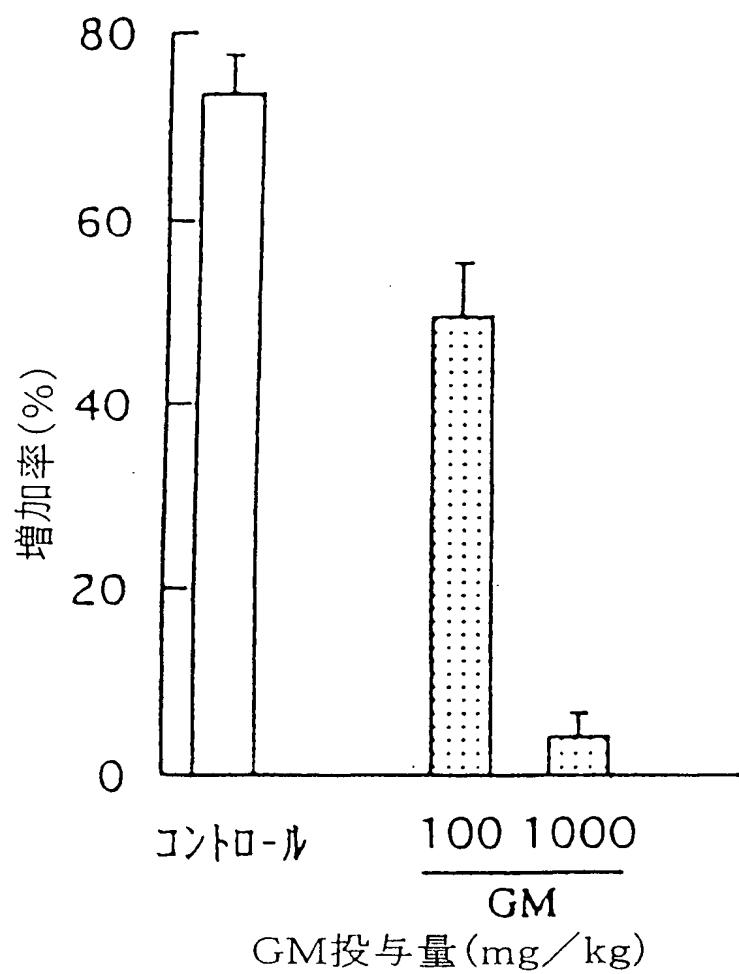


図 3-2

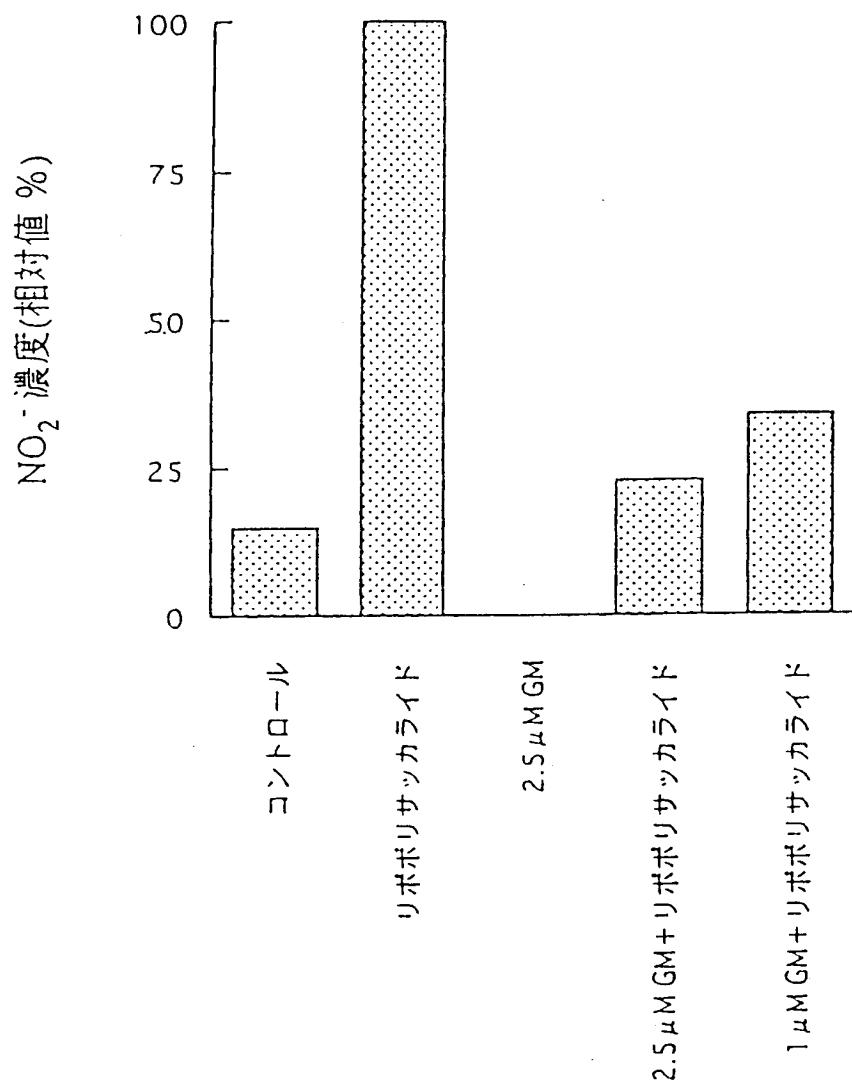


図 3 3

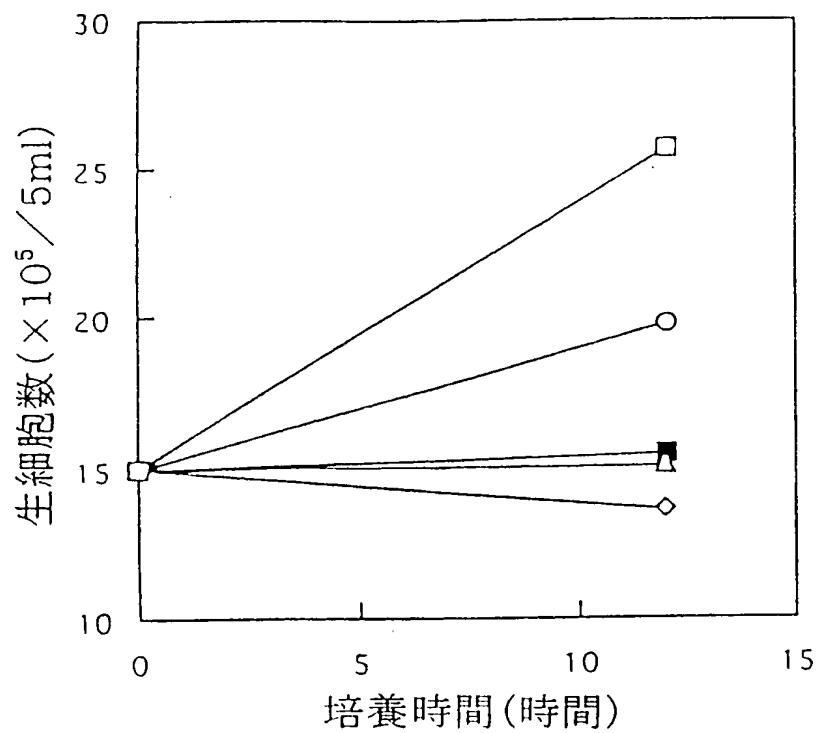


図 3-4

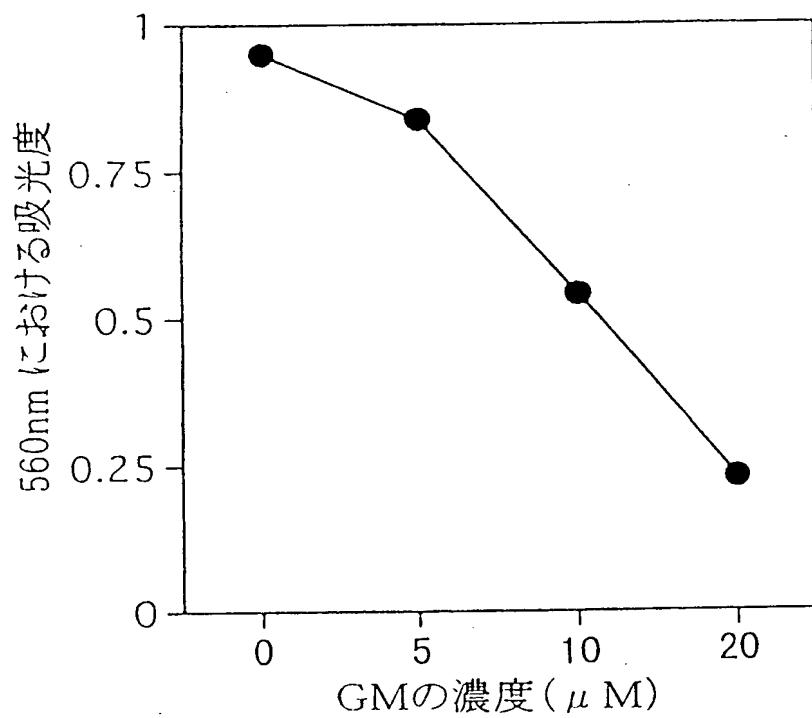


図 3 5

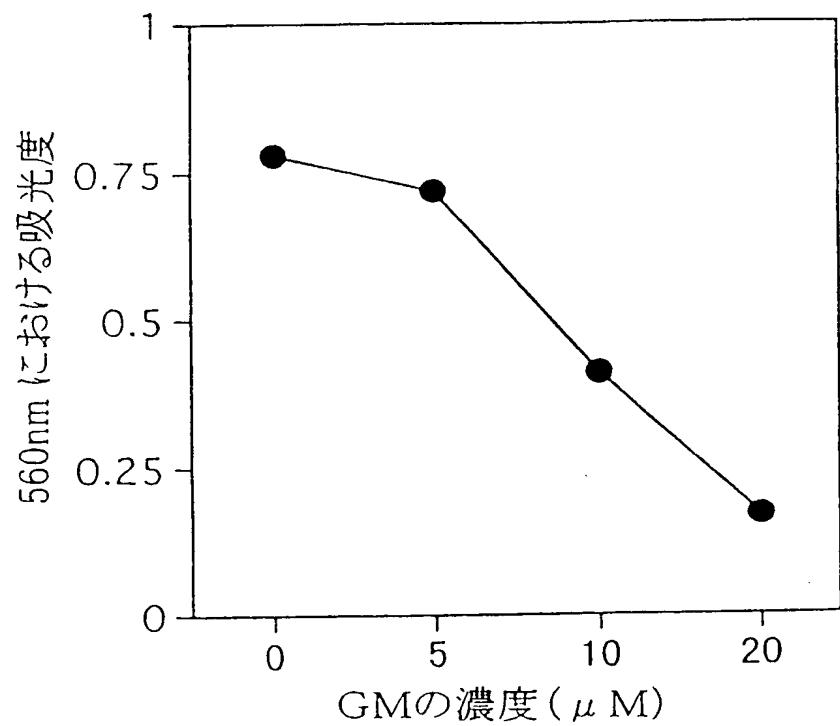


図 3 6

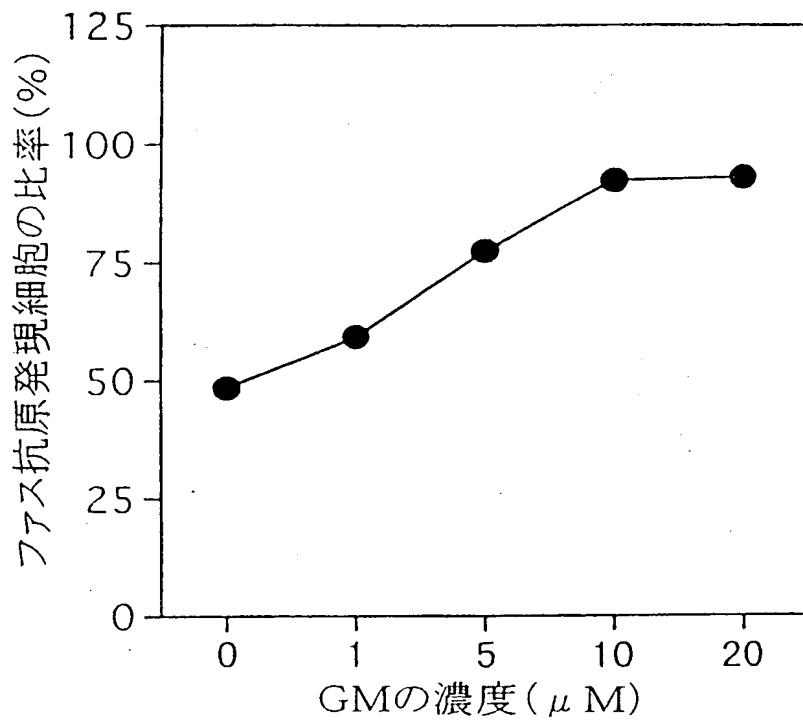


図 3 7

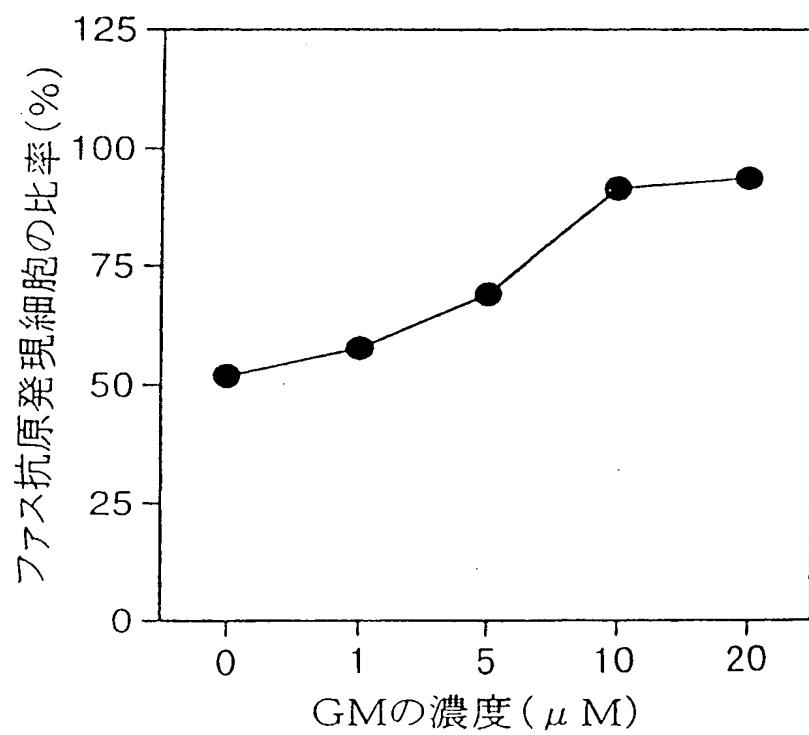


図 3 8

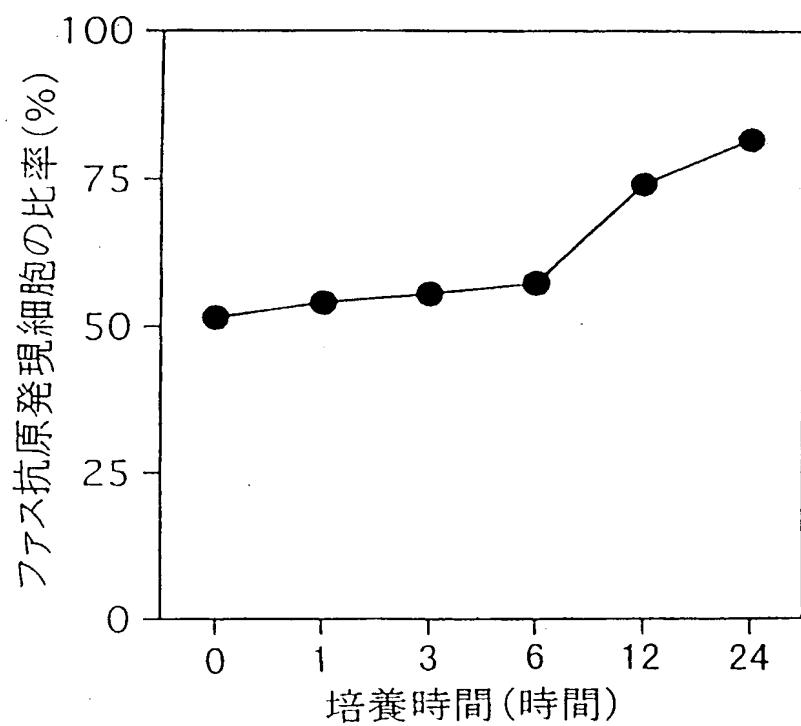


図 3 9

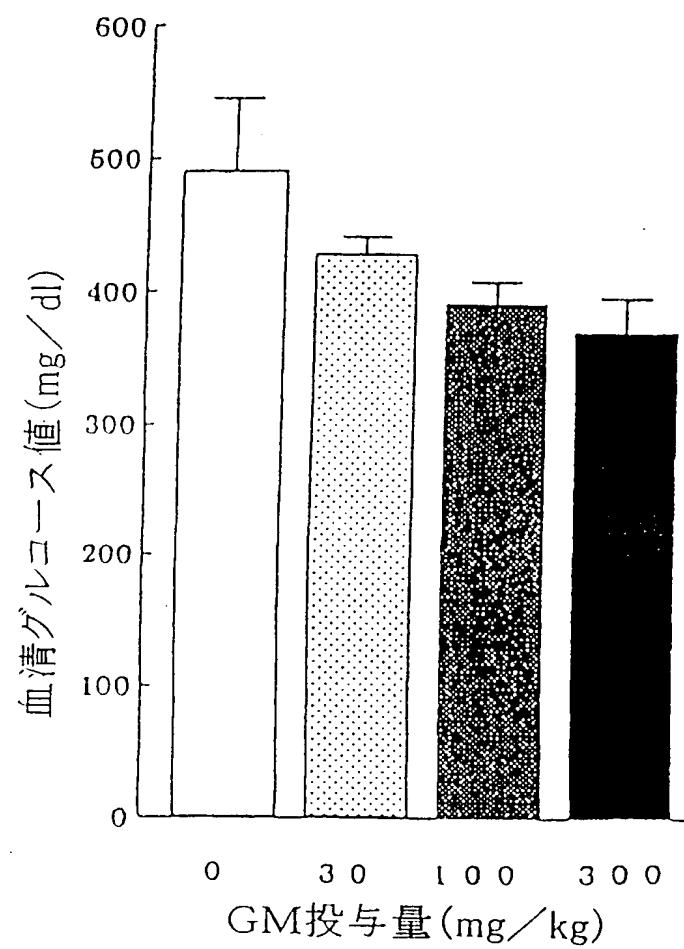


図 4 O

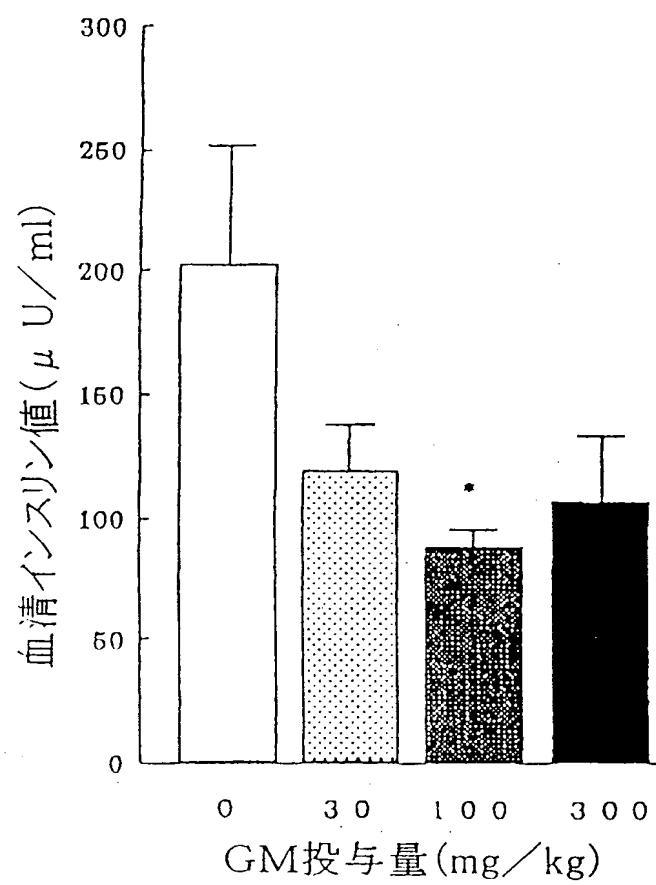


図 4-1

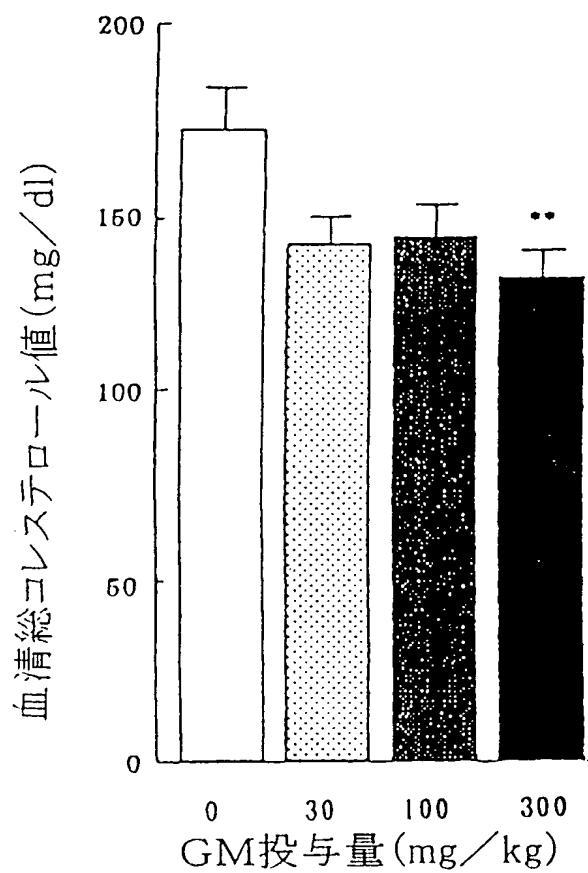


図 4 2

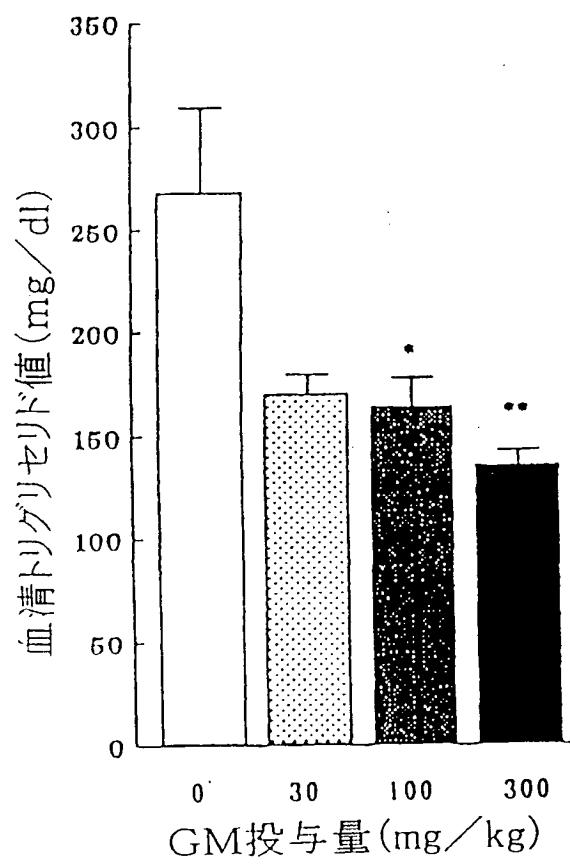


図 4-3

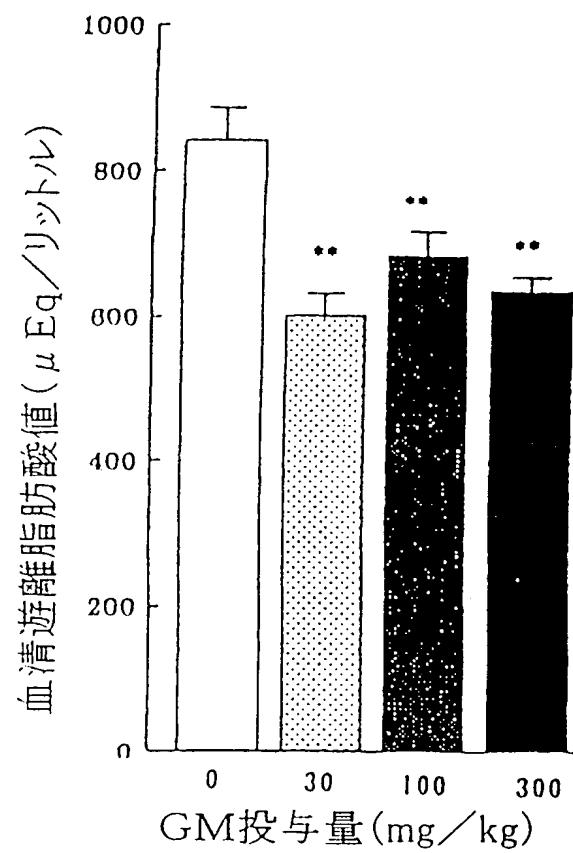


図 4-4

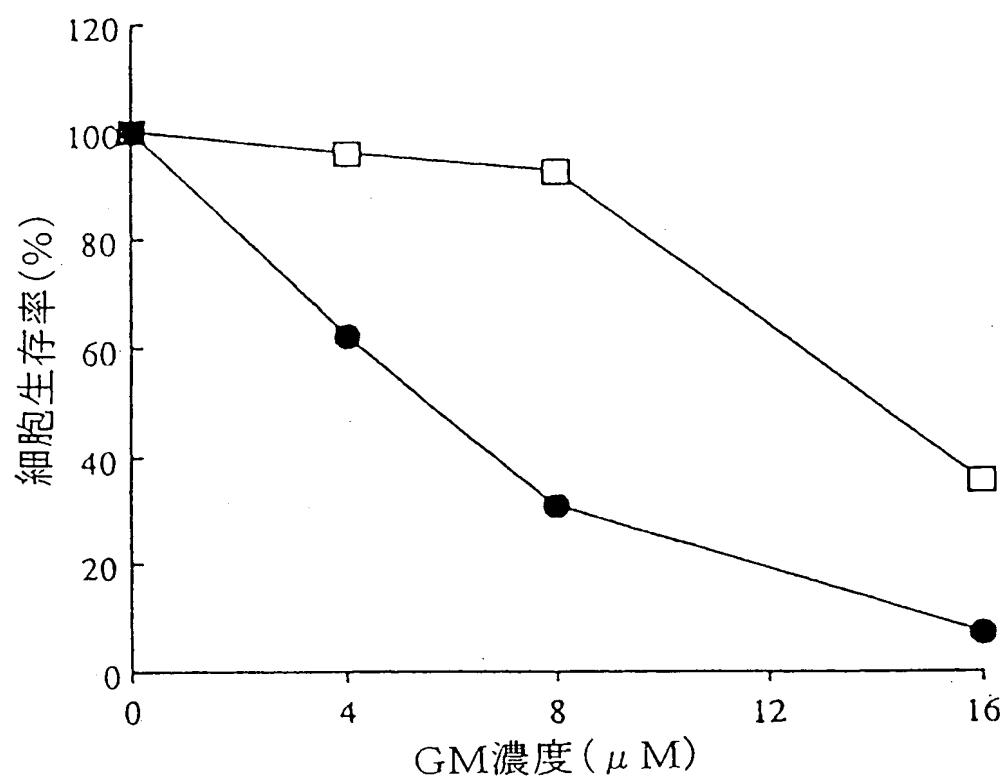


図 4 5

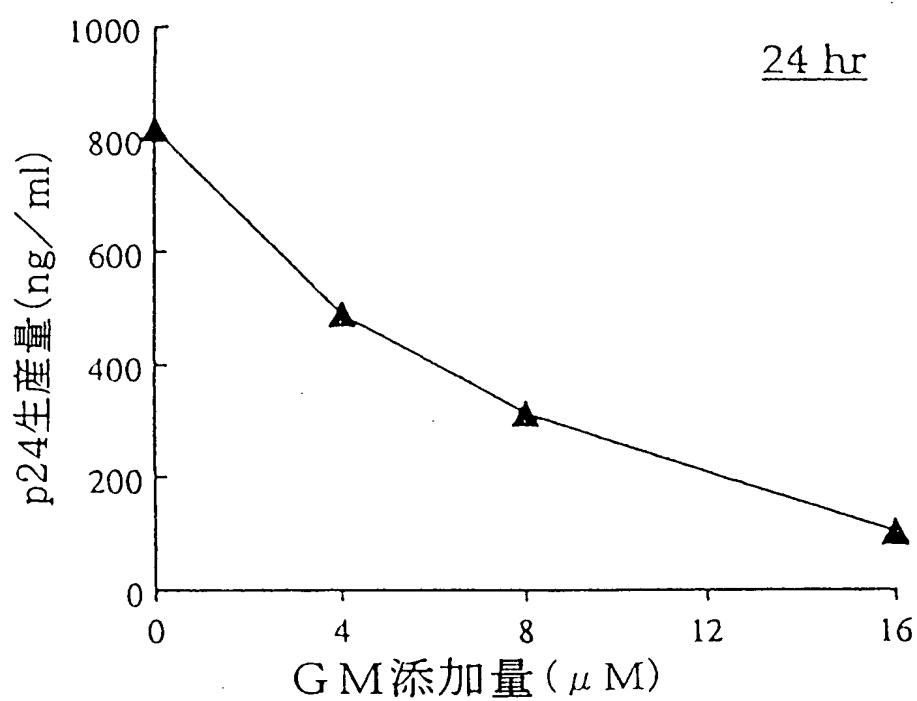


図 4 6

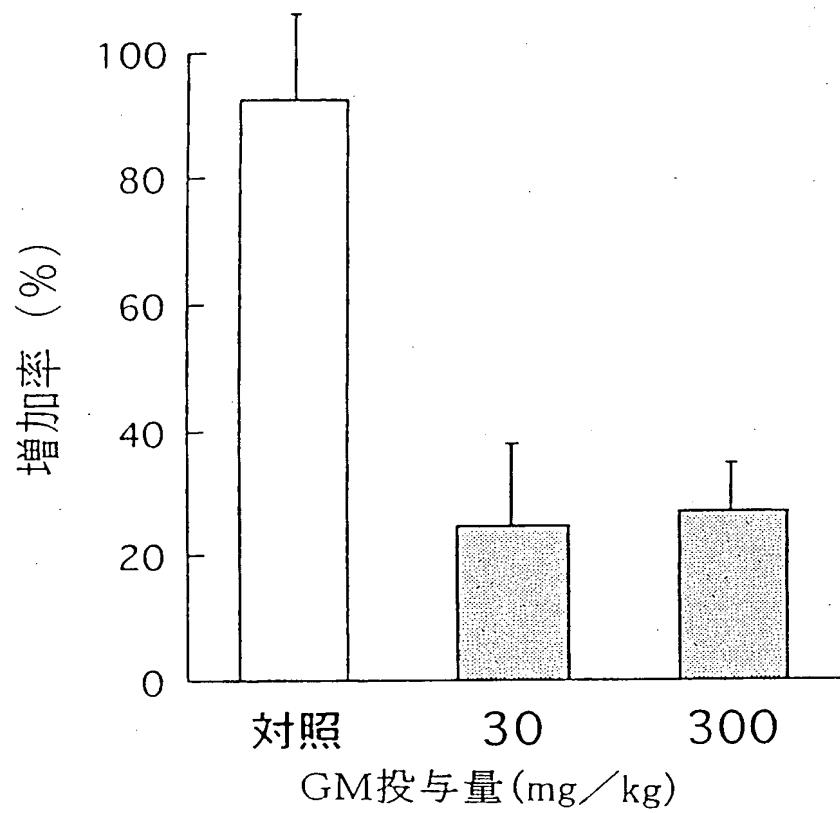


図 4-7

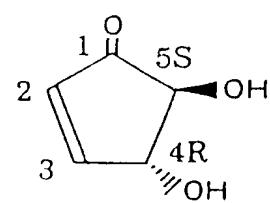
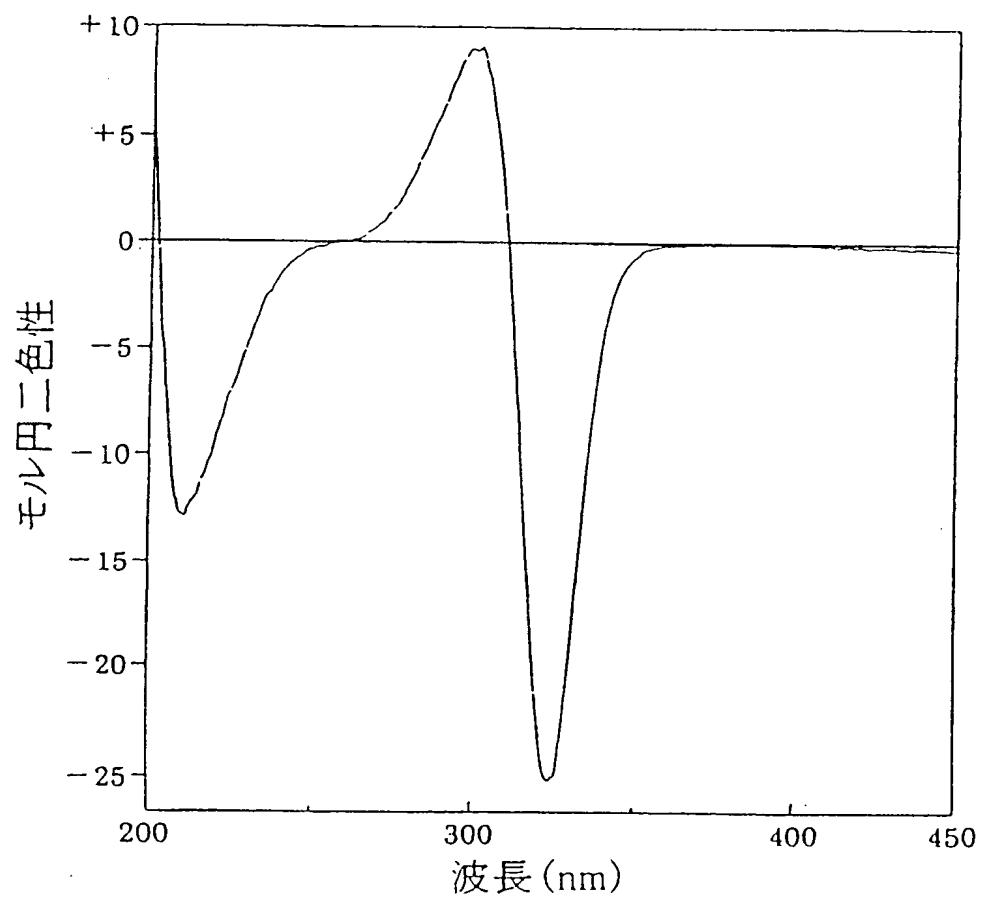
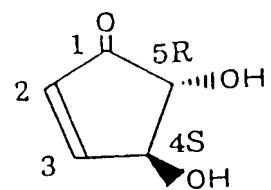
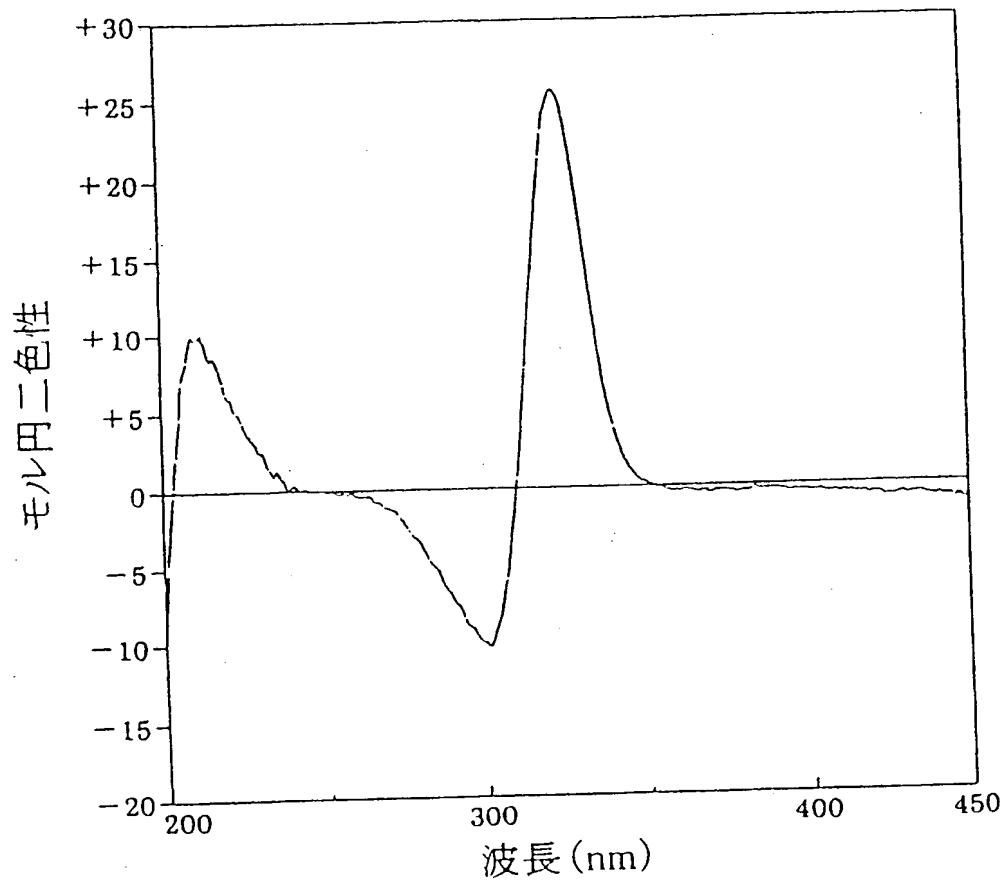


図 4 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00815

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**Int.Cl⁶ C07C323/50, C07C323/17, C07C323/22, A61K31/10, A61K31/12,
A61K31/195**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**Int.Cl⁶ C07C323/50, C07C323/17, C07C323/22, A61K31/10, A61K31/12,
A61K31/195**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 53-111037, A (Teijin Ltd.), September 28, 1978 (28. 09. 78) & US, 4180672, A	1-28

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
May 14, 1998 (14. 05. 98)

Date of mailing of the international search report
May 26, 1998 (26. 05. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/00815

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ C07C323/50, C07C323/17, C07C323/22, A61K31/10, A61K31/12, A61K31/195

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ C07C323/50, C07C323/17, C07C323/22, A61K31/10, A61K31/12, A61K31/195

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 53-111037, A(帝人株式会社), 28. 9月. 1978 (28. 09. 78) &US, 418067 2, A	1-28

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であつて出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であつて、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であつて、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 05. 98

国際調査報告の発送日

26.05.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

渡辺 陽子

印

411 9279

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



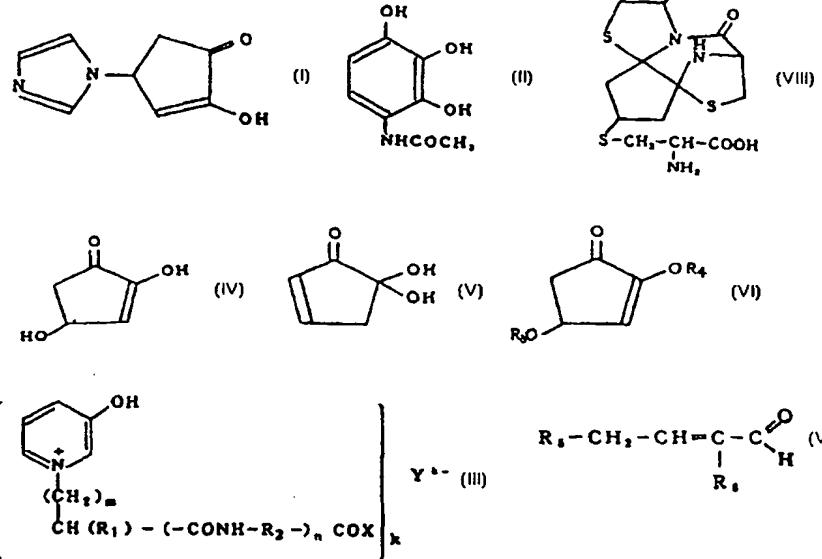
(51) 国際特許分類6 C07C 49/707, 49/753, 229/08, 233/25, C07D 213/65, 233/60, 513/18, A61K 31/12, 31/165, 31/415, 31/44, 31/495	A1	(11) 国際公開番号 WO99/29647 (43) 国際公開日 1999年6月17日(17.06.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05554		(74) 代理人 弁理士 安達光雄、外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)
(22) 国際出願日 1998年12月8日(08.12.98)		
(30) 優先権データ 特願平9/361644 特願平9/364356 特願平9/364813 特願平10/17660 特願平10/73018	1997年12月11日(11.12.97) 1997年12月19日(19.12.97) 1997年12月22日(22.12.97) 1998年1月14日(14.01.98) 1998年3月9日(09.03.98)	JP JP JP JP JP
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)		(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 榎 竜嗣(ENOKI, Tatsushi)[JP/JP] 小山信人(KOYAMA, Nobuto)[JP/JP] 猪飼勝重(IKAI, Katsuhige)[JP/JP] 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP] 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)		

(54) Title: APOPTOSIS INDUCER

(54) 発明の名称 アポトーシス誘発用物質

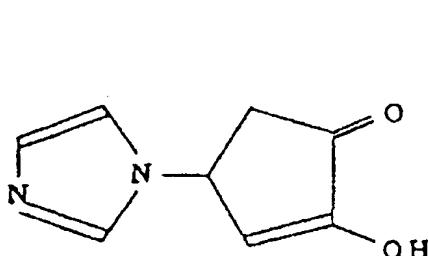
(57) Abstract

Apoptosis inducers represented by chemical formulae (I), (II), (VIII), (IV), (V), (VI), (III) and (VII); and medicinal compositions containing the same and usable as carcinostatic and the like.



(57)要約

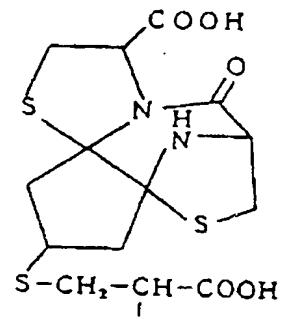
下記の化学式で表されるアポトーシス誘発用物質。それを含有する
制がん剤などに使用可能な医薬用組成物。



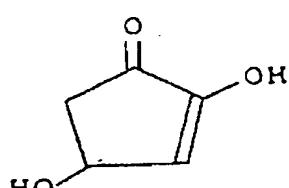
(I)



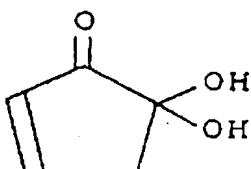
(II)



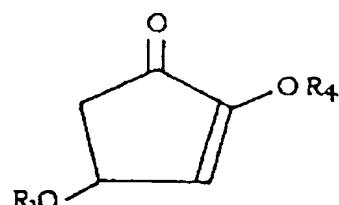
(VIII)



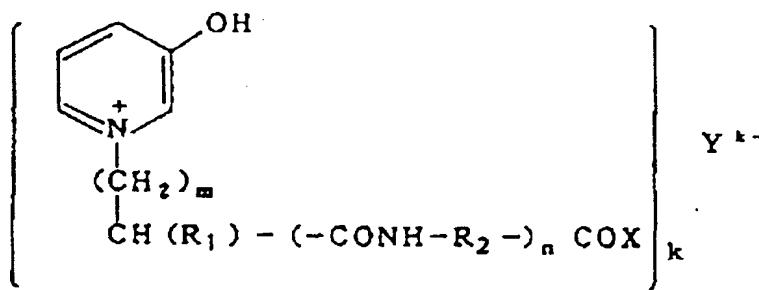
(IV)



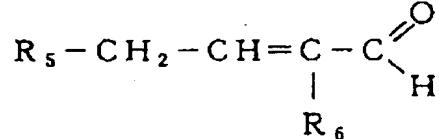
(V)



(VI)



(III)



(VII)

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シェラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴー
BE	ベルギー	GM	ガニア	MD	モルドavia	TJ	タジキスタン
BF	ブルガリア・ファン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マル	TT	トリニダッド・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴー	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴィエトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴースラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スードン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア				

明 細 書
アポトーシス誘発用物質

発明の属する技術分野

本発明は、医薬の分野で有用な、制がん作用等の生理活性を有するアポトーシス誘発用物質及びその用途に関する。

従来の技術

近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス（apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅）という様式が注目されている。

このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死である。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化されることにより、プログラム死タンパク質が合成され、またある場合には不活性型として細胞内に存在するプログラム死タンパク質が活性化される。こうして生成した活性型プログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要若しくは有害な細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

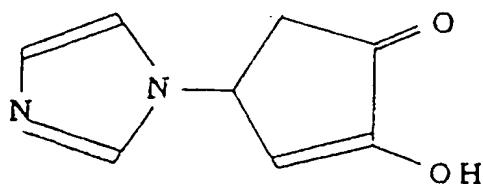
発明が解決しようとする課題

従来、臨床上の療法に用いられている薬物はアルキル化剤、代謝阻害剤、植物アルカロイド等の制がん剤、抗生物質、免疫促進剤、免疫調節剤など多岐にわたっているが、これらの薬物療法はいまだ完成したとはいがたい。

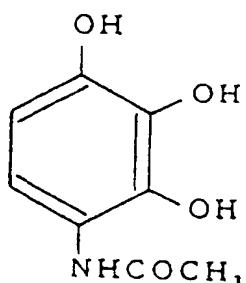
本発明の目的は、アポトーシス誘発作用等の生理機能を有する安全性の高い物質を開発し、該物質を有効成分とする制がん剤等の、該物質に感受性を示す疾患用の医薬品を提供することにある。

課題を解決するための手段

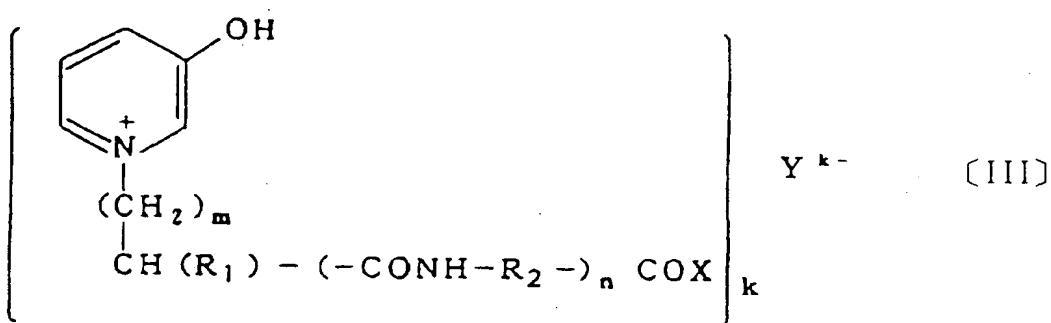
本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、下記式〔I〕～〔VIII〕でそれぞれ表されるアポトーシス誘発用物質若しくはその光学活性体、又はそれらの塩に関する。



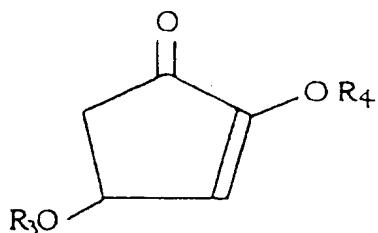
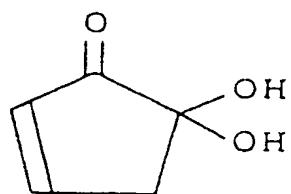
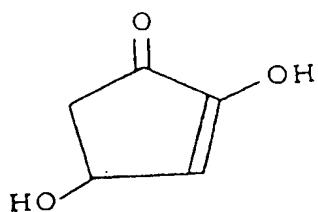
[I]



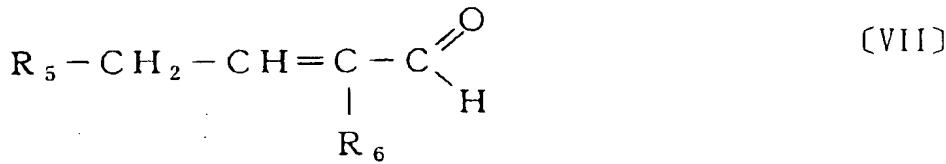
[II]



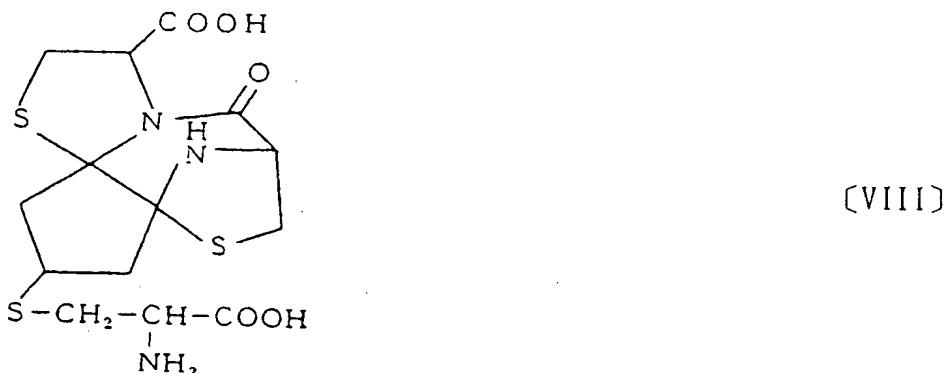
(式 [III] 中、 R_1 は H、アミノ基、若しくは低級アルキル基、又はアミノ酸における置換基を有する低級アルキル基を、 R_2 はアミノ酸におけるペプチド結合に関与するアミノ基とカルボキシル基を除いた 2 個の残基を、X は O^- 又はアミノ基を、 Y^{k-} は k 個の陰イオンを、m は 0 ~ 4 の整数を、n は 0 又は正の整数を、k は正の整数を表す。但し、n が 2 以上の場合、2 以上存在する R_2 は同一でも異なっていてもよく、X が O^- の場合は内部塩となり、 Y^{k-} は存在しない)



(式 [VI] 中、R₃、R₄ は同一であっても異なってもよく、炭素数が 1 ~ 3 のアルキル基である。)



(式 [VII] 中、R₅、R₆ は同一であっても異なってもよく、芳香族アミノ酸の芳香環である。)



本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明のアポトーシス誘発用物質若しくはその光学活性体、又はそれらの塩を含有することを特徴とする医薬組成物に関する。

本発明の第2の発明における医薬組成物としては制がん剤が例示される。

図面の簡単な説明

図1はイミダゾリルシクロベンテノンの逆相HPLCでの溶出パターンを示す図である。

図2はイミダゾリルシクロベンテノンのマススペクトルを示す図である。

図3はイミダゾリルシクロベンテノンの¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図4はイミダゾリルシクロベンテノンの¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図5はイミダゾリルシクロベンテノンのUV吸収スペクトルを示す図である。

図6はイミダゾリルシクロベンテノンのIR吸収スペクトルを示す図である。

図7は逆相HPLCにおける保持時間と210nmにおける吸光度の関係を表す図である。

図8はトリヒドロキシフェニルアセトアミドのマススペクトルを示す図である。

。

図9はトリヒドロキシフェニルアセトアミドの¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図10はトリヒドロキシフェニルアセトアミドの¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図11はトリヒドロキシフェニルアセトアミドのIRスペクトルを示す図である。

図12はB-UGの逆相HPLCにおける溶出時間と215nmにおける吸光度の関係を示す図である。

図13はB-UGのマススペクトルを示す図である。

図14はB-UGの¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図15はB-UGの¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図16はB-UGのUV吸収スペクトルを示す図である。

図17はB-UGのIR吸収スペクトルを示す図である。

図18はMC2のマススペクトルを示す図である。

図19はMC2の¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図20はMC2の¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図21はMC2のUVスペクトルを示す図である。

図22はMC2のIRスペクトルを示す図である。

図23はHMC2の¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図24はHMC2の¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図25はS-1127の逆相HPLCにおける溶出時間と215nmにおける吸光度の関係を示す図である。

図26はS-1127のマススペクトルを示す図である。

図27はS-1127の¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図28はS-1127の¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図29はS-1127のUV吸収スペクトルを示す図である。

図30はS-1127のIR吸収スペクトルを示す図である。

図31は培養時間と生細胞数の関係を示す図である。

図32はtCDの溶出時間と215nmにおける吸光度の関係を示す図である

図33はLCD1のマススペクトルを示す図である。

図34はLCD1の¹H-NMRスペクトルを示す図である。

図35はLCD1の¹³C-NMRスペクトルを示す図である。

図36はLCD1のUV吸収スペクトルを示す図である。

図37はLCD1のIR吸収スペクトルを示す図である。

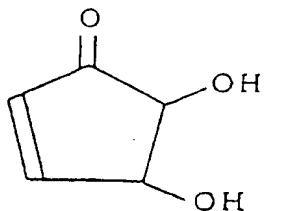
図38はLCD2のマススペクトルを示す図である。

図39はLCD2の¹H-NMRスペクトルを示す図である。

発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明者らはまず式〔I〕で表される2-ヒドロキシ-4-(1-イミダゾリル)-2-シクロ penten-1-オン(以下、単にイミダゾリルシクロ penten-1-オンと称す)が、下記式〔IX〕で表される4,5-ジヒドロキシ-2-シクロ penten-1-オン(以下、単にシクロ penten-1-オンと称す)と、イミダゾールとの反応により生成し、このイミダゾリルシクロ penten-1-オンがアボトーシス誘発作用及び強いがん細胞増殖抑制活性を有することを見出した。



〔IX〕

即ち、本発明により式〔IX〕で表されるシクロ penten-1-オン若しくはその光学活性体、又はそれらの塩と、イミダゾールとを反応させることを特徴とする式〔I〕で表される2-ヒドロキシ-4-(1-イミダゾリル)-2-シクロ penten-1-オン若しくはその光学活性体、又はそれらの塩の製造方法が提供される。

本発明において使用する式〔IX〕で表されるシクロ penten-1-オンは、化学合成法により合成することができ〔カーボハイドレート リサーチ(Carbohydrate Research.)、第247巻、第217~222頁(1993)、ヘルベチカ キミカ アク

タ (Helvetica Chimica Acta) 、第 55 卷、第 2838 ~ 2844 頁 (1972)] 、またウロン酸、ウロン酸誘導体、ウロン酸含有糖化合物、ウロン酸誘導体含有糖化合物、ウロン酸含有糖化合物含有物又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物から選択される少なくとも 1 種の物の加熱処理物中に生成する化合物であつて [第 56 回日本癌学会総会記事、第 599 頁、1997 年、PCT/JP97/03052 号明細書参照] 、本発明ではその加熱処理物、その精製物も使用することがきる。

ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物である多糖類は公知の化学的、酵素学的、物理的な処理方法により製造することができ、例えば市販のペクチン、アルギン酸を使用すればよい。なお合成法により合成されるウロン酸、ウロン酸誘導体、オリゴ糖等も本発明で使用することができる。

例えば、ウロン酸として D- グルクロン酸を使用し、その 1% 溶液を 121°C で 4 時間加熱処理することにより、加熱処理物中に式 [IX] で表されるシクロベンテノンが生成する。この加熱処理物中のシクロベンテノンを溶媒で抽出し、抽出物を濃縮する。次にこの濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、溶出するシクロベンテノン画分を濃縮し、濃縮物からシクロベンテノンをクロロホルムで抽出し、抽出濃縮物の順相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、加熱処理物中のシクロベンテノンが単離される。

単離されたシクロベンテノンを光学分割することにより、(-)-4,5-ジヒドロキシ-2-シクロベンテン-1-オン及び(+)-4,5-ジヒドロキシ-2-シクロベンテン-1-オンを得ることができる。当然、合成方法により得られたシクロベンテノンも光学分割することができる。

光学活性体の分離はラセミ混合物の機械的分割、優先晶出法、ジアステレオマー塩あるいは包接化合物としての結晶化による分割、酵素・微生物による動力学的分割、クロマトグラフィーによる分割等により行うことができる。

クロマトグラフィーによる分割としては、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等を用いることができ、それそれに適したキラル固定相を使用すればよい。液体クロマトグラフィーによる光学分割と

してはキラルな固定相を用いる方法、キラルな溶離液を用いる方法、ジアステレオマーとしての分離等を用いることができる。キラル固定相としてはアミド系固定相、尿素系固定相、配位子交換型固定相、多糖・多糖誘導体固定相、タンパク質固定相、ポリメタクリル酸エステル固定相、ポリメタクリルアミド固定相等が使用できる。溶離液としてはヘキサン系、アルコール系、水（緩衝液）系等が使用でき、上記固定相との組合せにおいて適宜使用することができる。

例えば、シクロペンテノンをエタノールに溶かす。このエタノール溶液にヘキサン／エタノール（94／6）を更に加え、シクロペンテノン溶液を調製する。この試料溶液を、例えばキラールパック AS（ダイセル化学工業）カラムを用いカラム温度：40°C、移動相：ヘキサン／エタノール（94／6）でHPLCを行うことにより、シクロペンテノンを光学分割することができる。

光学分割 HPLC 条件

カラム：キラールパック AS（ダイセル化学工業）2.0 cm×25.0 cm

カラム温度：40°C

移動相：ヘキサン／エタノール（94/6）

流速：14.0 ml/min

検出：UV 210 nm

試料注入量：150 μl (2.55 mg)

分割された（-）トランス-4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテニ-1-オン〔以下、（-）体シクロペンテノンと称す〕の旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} - 105^{\circ}$ （ ± 0.30 、エタノール）であり、（+）トランス-4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテニ-1-オン〔以下、（+）体シクロペンテノンと称す〕の旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} + 104^{\circ}$ （ ± 0.53 、エタノール）である。なお旋光度は前記のDIP-370型旋光計（日本分光社製）を用いて測定した。（-）体シクロペンテノン及び（+）体シクロペンテノンの上記光学分割HPLCの溶出時間はそれぞれ33分、40分である。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体、又はそれらの塩と、イミダゾールとを反応させることにより、反応液中に本発明の式〔I〕で表されるイミダゾリ

ルシクロペンテノン若しくはその光学活性体、又はそれらの塩が生成する。イミダゾールは市販品を使用できるほか、グリオキサールとホルマリンとアンモニアより、又はイミダゾール-4, 5-ジカルボン酸の脱炭酸により合成できる。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体、又はそれらの塩と、イミダゾールとの反応は通常pH中性下で行うのが良い。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体、又はそれらの塩と、イミダゾールとが反応し、生成したイミダゾリルシクロペンテノン若しくはその光学活性体、又はそれらの塩は強いがん細胞増殖抑制活性を有し、この活性を指標にイミダゾリルシクロペンテノン若しくはその光学活性体、又はそれらの塩を反応液中から精製、単離することができる。精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、反応生成物中のイミダゾリルシクロペンテノン若しくはその光学活性体、又はそれらの塩を精製、単離することができる。

例えばシクロペンテノンとイミダゾールを37°Cで1時間反応させることにより、反応液中に式〔I〕で表されるイミダゾリルシクロペンテノンが生成し、この誘導体を含有する反応生成物の順相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、イミダゾリルシクロペンテノンを精製、単離することができ、またその光学分割により光学活性体を得ることができる。

イミダゾリルシクロペンテノンの塩としては、医薬として許容される塩があり、例えば塩酸塩、硫酸塩、酢酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩が例示され、公知の方法にて変換することができる。

本発明者らは次に、N-アセチルヘキソサミンジアルドース又はその誘導体を加熱することにより、式〔II〕で表されるN-(2, 3, 4-トリヒドロキシフェニル)アセトアミドが生成し、この物質がアポトーシス誘発作用及び強いがん細胞増殖抑制活性を有することを見出した。

即ち、本発明により、N-アセチルヘキソサミンジアルドース又はその誘導体を加熱する工程を包含することを特徴とする式〔II〕で表されるN-(2, 3,

4-トリヒドロキシフェニル)アセトアミド又はその塩の製造方法が提供される。

また該製造方法としては、N-アセチルヘキソサミンジアルドース又はその誘導体が下記式〔X〕で表されるN-アセチル-D-ガラクトサミンジアルドース又はその対掌体あるいはそれらの誘導体であるN-(2, 3, 4-トリヒドロキシフェニル)アセトアミド又はその塩の製造方法が例示される。



N-アセチルヘキソサミンジアルドースはN-アセチルヘキソサミンの6位が酸化されてアルデヒドになったものであり、分子式C₈H₁₃NO₆、分子量219.19である。

N-アセチルヘキソサミンジアルドースは例えばN-アセチルヘキソサミンの6位を化学的又は酵素的に酸化することによって製造できる。化学的酸化としては、第一鉄塩存在下過酸化水素で酸化するフェントン(Fenton)法が挙げられる。また、酵素的酸化としては、例えばガラクトースオキシダーゼ〔E.C.1.1.3.9; クーパー(Cooper)ら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.)、第234巻、第445~448頁(1959)〕による酸化が挙げられる。N-アセチル-D-ガラクトサミンをガラクトースオキシダーゼで酸化することによりN-アセチルガラクトサミンジアルドースが得られる。

N-アセチルヘキソサミンジアルドースの誘導体としては、エステル、エーテル等があり、加熱処理により式〔II〕で表されるN-(2, 3, 4-トリヒドロキシフェニル)アセトアミド(以下、トリヒドロキシフェニルアセトアミドと称す)が生成するものはすべて本発明に含まれる。N-アセチルヘキソサミンジア

ルドースのエステルとしては、例えば酢酸エステル、ギ酸エステル、硫酸エステル、リン酸エステル等があり、N-アセチルヘキソサミンジアルドースより製造できる。またエーテル化によりエーテル化合物も作製することができ、このエーテル化合物を本発明に使用することができる。N-アセチルヘキソサミンジアルドース及び／又はその誘導体を含有する化合物も本発明で使用できる。

本発明において、N-アセチルヘキソサミンジアルドース又はその誘導体とは、その加熱処理物中に式〔II〕で表されるトリヒドロキシフェニルアセトアミドが生成すれば特に限定はない。

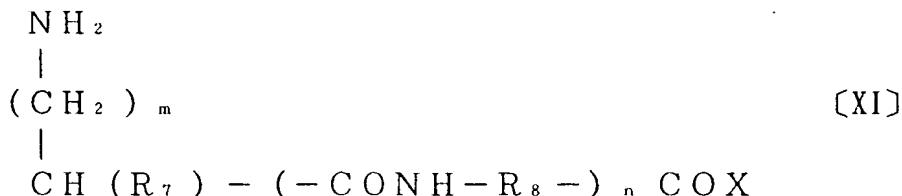
トリヒドロキシフェニルアセトアミドは強いがん細胞増殖抑制活性を有し、この活性を指標にトリヒドロキシフェニルアセトアミドを反応液中から精製、単離することができる。精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、反応生成物中のトリヒドロキシフェニルアセトアミドを精製、単離することができる。

例えばN-アセチルヘキソサミンジアルドースを121°Cで4時間反応させることにより、反応液中に式〔II〕で表されるトリヒドロキシフェニルアセトアミドが生成し、この誘導体を含有する反応生成物の逆相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、トリヒドロキシフェニルアセトアミドを精製、単離することができる。

トリヒドロキシフェニルアセトアミドの塩としては、医薬として許容される塩があり、例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩が例示され、公知の方法にて変換することができる。

本発明者らは次に、下記(a1)、(a2)、(a3)より選択される少なくとも1種の物と一般式〔XI〕で表される化合物とを、共存下で加熱処理することにより、一般式〔III〕で表される3-ヒドロキシ-1-置換ピリジニウム塩（以下、置換ピリジニウム塩と称す）が生成し、この物質がアポトーシス誘発作用及びがん細胞増殖抑制活性を有することを見出した。

- (a 1) ウロン酸又はウロン酸誘導体、
- (a 2) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物、
- (a 3) ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物含有物。



(式 [XI] 中、 R_7 は H 、 アミノ基、 若しくは低級アルキル基、 又はアミノ酸における置換基を有する低級アルキル基を、 R_8 はアミノ酸におけるペプチド結合に関与するアミノ基とカルボキシル基を除いた 2 個の残基を、 X は O H 又はアミノ基を、 m は $0 \sim 4$ の整数を、 n は 0 又は正の整数を表す。但し、 n が 2 以上の場合、 2 以上存在する R_8 は同一でも異なっていてもよい)

即ち本発明により、 上記 (a 1)、 (a 2)、 (a 3) より選択される少なくとも 1 種の物と一般式 [XI] で表される化合物又はその誘導体とを、 共存下で加熱処理することを特徴とする、 一般式 [III] で表される 3-ヒドロキシ-1-置換ピリジニウム塩又はその光学活性体の製造方法が提供される。

ウロン酸はグリクロン酸ともいい、 アルドースのアルデヒド基はそのままにして他端の第 1 アルコール基だけをカルボキシル基に酸化したヒドロキシアルデヒド酸の総称であり、 天然では動植物の各種の多糖の構成成分として存在する。

本発明で使用することができるウロン酸は特に限定されるものでなく、 例えばガラクトロン酸、 グルクロン酸、 グルロン酸、 マンヌロン酸、 イズロン酸又はこれらの塩等があり、 ウロン酸の誘導体としては、 それらのラクトン、 それらのエステル、 それらのアミド、 それらの塩等がある。 ウロン酸のラクトンとしてはグルクロノ-6, 3-ラクトン、 マンヌロノ-6, 3-ラクトン、 イズロノ-6, 3-ラクトン等が例示される。

ウロン酸エステルとしては、 例えばメチルエステル、 エチルエステル、 プロピレングリコールエステル、 カルボキシメチルエステル等があり、 ウロン酸より製造することができる。 また、 ウロン酸のアミド化によりウロン酸アミドも製造す

ることができる。更にこれらの塩は常法により製造することができる。

次に本明細書において、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物とは特に限定されるものでなく、例えばベクチン、ベクチン酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、フコイダン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマタン硫酸、それらの化学的、酵素的、物理的処理物である、その分解物、分解物の誘導体、分解物の塩を使用することができる。

本発明で使用する一般式〔XI〕で表される化合物は、上記(a 1)、(a 2)、(a 3)より選択される少なくとも1種の物、好適にはグルクロン酸と共に加熱することによって一般式〔III〕で表される置換ピリジニウム塩が生成するものであれば特に限定はない。

一般式〔XI〕で表される化合物の種類は、目的とする置換ピリジニウム塩及び／又はその光学活性体の一般式〔III〕におけるR₇、R₈、Xの種類及びm、nの値によって適宜選択すればよい。一般式〔XI〕で表される化合物としては例えば、α-アミノ酸が使用でき、不斉炭素を含むアミノ酸に関しては、そのL-体、D-体及びそれらの混合物が使用できる。また一般式〔XI〕で表される化合物としてはα-アミノ酸のほかに、例えばβ-アミノ酸、オリゴペプチド、ポリペプチド、糖ペプチドが使用できる。また、これらの塩、エステル、アミド、ラクトン、ラクタム等の誘導体も使用可能である。

本発明においては、一般式〔XI〕で表される化合物の含有物も使用できる。

上記(a 1)、(a 2)、(a 3)より選択される物と一般式〔XI〕で表される化合物とを、共存下で加熱すると置換ピリジニウム塩又はその光学活性体が生成する。置換ピリジニウム塩又はその光学活性体が生成する条件であれば、加熱時の上記(a 1)、(a 2)、(a 3)より選択される物と一般式〔XI〕で表される化合物の濃度、pH、加熱温度、加熱時間等の反応条件には特に限定はない。

生成した置換ピリジニウム塩はそのピリジン環に正電荷を持っており、一般式〔III〕においてXがO⁻の場合は内部塩を形成し、アミノ基である場合、1価の陰イオンと共に塩を形成する。また、多価の陰イオンと複数の置換ピリジニウ

ム塩も塩を形成し、そのような塩も本発明に含まれる。

また、置換ピリジニウム塩の正電荷と負電荷が各々対イオンと共に塩を形成し得る。このような塩も本発明に含まれる。

生成した置換ピリジニウム塩又はその光学活性体はがん細胞増殖抑制活性を指標として公知の方法で精製、単離できる。精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、反応生成物中の置換ピリジニウム塩又はその光学活性体を精製、単離することができる。

例えばグルクロン酸とグリシンの水溶液を121°Cで30分間反応させることにより、反応液中に下記式〔XII〕で表される1-カルボキシメチル-3-ヒドロキシピリジニウム内部塩（以下、B-UGと称す）が生成する。この誘導体を含有する反応生成物のシリカカラムクロマトグラフィー及び逆相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、B-UGを精製、単離することができる。



精製した置換ピリジニウム塩がラセミ体である場合、例えば前述の方法で光学分割することにより、(-)-置換ピリジニウム塩及び(+)-置換ピリジニウム塩を得ることができる。

本発明者らは次に、シクロペンテノン又はその光学活性体をアルコールと反応させることにより一般式〔VI〕で表されるシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体が生成し、一般式〔VI〕で表されるシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体を酸処理することにより式〔IV〕で表される2,4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び式〔V〕で表される5,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンから成る組成物が生成すること、シクロペンテノン又

はその光学活性体を酸処理することにより式〔IV〕で表される2, 4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び式〔V〕で表される5, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンから成る組成物が生成すること、及びこのようにして生成する、式〔IV〕で表される2, 4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び式〔V〕で表される5, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンから成る組成物が強いがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘導活性を有することを見出した。

即ち本発明により、式〔IV〕で表される2, 4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び下記式〔V〕で表される5, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンより成る組成物が提供される。

本発明により、一般式〔VI〕で表されるシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体を酸処理する工程を包含することを特徴とする上記組成物の製造方法が提供される。

本発明により、シクロペンテノン又はその光学活性体を酸処理する工程を包含することを特徴とする前記組成物の製造方法が提供される。

本発明により上記組成物を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物が提供される。

本発明により、シクロペンテノン又はその光学活性体と、炭素数1～3のアルコール、あるいはそれらの反応性誘導体を反応させる工程を包含することを特徴とする一般式〔VI〕で表されるシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体の製造方法が提供される。

シクロペンテノン及び／又はその光学活性体と、アルコールとを反応させることにより、反応液中に本発明の一般式〔VI〕で表されるシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体が生成する。本発明の炭素数1～3のアルコールとしてはメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールが挙げられる。シクロペンテノン及び／又はその光学活性体とアルコールとの反応は通常pH酸性下で行うのが良い。なお、両原料の反応性誘導体の例としてはナトリウム塩のような塩類、酸ハライド、活性エステル等が挙げられる。

シクロペンテノン又はその光学活性体とアルコールとが反応し、生成したシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体の精製、単離手段としては化学的方法、物理的方法等の公知の手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、反応生成物中のシクロペンテノン誘導体又はその光学活性体を精製、単離することができる。

一般式〔VI〕で表されるシクロペンテノン誘導体を酸処理することによって、式〔IV〕で表される2, 4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び式〔V〕で表される5, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンより成る組成物が生成する。酸の種類、濃度、酸処理時の温度、反応時間に特に限定はなく、上記反応が進行する条件であればよい。使用する酸の例としては塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸、酢酸、ギ酸、クエン酸、乳酸、アスコルビン酸等の有機酸が挙げられる。

例えばシクロペンテノンを10N HCl:メタノール=5:95に溶解し、37°Cで1晩反応させることにより反応液中に一般式〔VI〕で表されるシクロペンテノン誘導体が生成し、この誘導体を含有する反応生成物の逆相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、シクロペンテノン誘導体を精製、単離することができる。

また、上記一般式〔VI〕で表されるシクロペンテノン誘導体を1mM HClに溶解し、37°Cで16時間反応させることにより式〔IV〕で表される2, 4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び式〔V〕で表される5, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンより成る組成物が生成し、これを含有する反応生成物の逆相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、2, 4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び5, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンより成る組成物を精製することができる。

また、シクロペンテノンを酸処理することによって式〔IV〕で表される2, 4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び式〔V〕で表される5, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンより成る組成物が生成する。酸

の種類、濃度、酸処理時の温度、反応時間に特に限定はなく、上記反応が進行する条件であればよい。使用する酸の例としては塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸、酢酸、ギ酸、クエン酸、乳酸、アスコルビン酸等の有機酸が挙げられる。

例えば、シクロペンテノンを300 mM硫酸に溶解し、100°Cで4時間反応させると2,4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び5,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンより成る組成物が生成する。この反応混合物の逆相HPLCを行うことにより2,4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び5,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンより成る組成物が精製できる。

本発明者らは次に、下記(b1)、(b2)、(b3)より選択される少なくとも1種の物と上記(a1)、(a2)、(a3)より選択される少なくとも1種の物を共存下加熱処理することにより一般式[VII]で表される化合物又はその塩が生成し、この物質ががん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発作用を有することを見出した。

本発明により、下記(b1)、(b2)、(b3)より選択される少なくとも1種の物と上記(a1)、(a2)、(a3)より選択される少なくとも1種の物を共存下加熱処理することを特徴とする、一般式[VII]で表される化合物又はその塩の製造方法が提供される。

- (b1) 芳香族アミノ酸、
- (b2) 芳香族アミノ酸誘導体、
- (b3) 芳香族アミノ酸及び／又は芳香族アミノ酸誘導体含有物。

本発明で使用する芳香族アミノ酸、芳香族アミノ酸誘導体、芳香族アミノ酸含有物及び／又は芳香族アミノ酸誘導体含有物は、上記(a1)、(a2)、(a3)より選択される少なくとも1種の物と共に加熱することによって式[VII]で表される化合物又はその塩が生成するものであれば特に限定はない。

芳香族アミノ酸としては、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、DOPA、ドーパミン等が例示され、そのL-体、D-体及びそれらの混合物が使用できる。芳香族アミノ酸誘導体としては、例えば芳香族アミノ酸

含有オリゴペプチド、芳香族アミノ酸含有ポリペプチド、芳香族アミノ酸含有糖ペプチドが使用できる。また、これらの塩、エステル、アミド、ラクトン、ラクタム等も使用可能である。

本発明においては、芳香族アミノ酸及び／又は該アミノ酸誘導体含有物も使用できる。

上記 (a 3) に上記 (b 1)、(b 2) から選択される少なくとも 1 種の物が含有されている場合、又は上記 (b 3) に上記 (a 1)、(a 2)、(a 3) から選択される少なくとも 1 種の物が含有されている場合には、加熱処理に先立つて上記 (b 1)、(b 2)、(b 3) より選択される少なくとも 1 種の物、又は上記 (a 1)、(a 2)、(a 3) より選択される少なくとも 1 種の物を更に添加することが必須でないことは当然である。

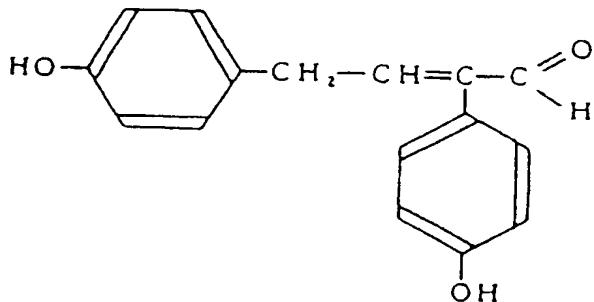
上記 (a 1)、(a 2)、(a 3) より選択される少なくとも 1 種の物と上記 (b 1)、(b 2)、(b 3) より選択される少なくとも 1 種の物とを共存下加熱処理すると一般式 [VII] で表される化合物又はその塩が生成する。当該化合物又はその塩が生成する条件であれば、加熱処理時の上記 (a 1)、(a 2)、(a 3) より選択される少なくとも 1 種の物と上記 (b 1)、(b 2)、(b 3) より選択される少なくとも 1 種の物の濃度、pH、温度、時間等の条件には特に限定はない。

加熱処理において (a 1)、(a 2)、(a 3) より選択される少なくとも 1 種の物は酸化剤として作用する。

生成した一般式 [VII] で表される化合物又はその塩はがん細胞増殖抑制活性を指標として公知の方法で精製、単離できる。精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、反応生成物中的一般式 [VII] で表される化合物又はその塩を精製、単離することができる。

例えばグルクロン酸とチロシンの水溶液を 121°C で 4 時間反応させることにより、反応液中に式 [XIII] で表される 2, 4-ビス (p-ヒドロキシフェニル

) - 2-ブテナール (以下 S-1127 と略す) 又はその塩が生成する。この化合物を含有する反応生成物のシリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、S-1127 又はその塩を精製、単離することができる。



[XIII]

本発明で得られる一般式 [VII] で表される化合物又はその塩は 2 位と 3 位の炭素原子の間が 2 重結合であり、シス体とトランス体が存在する。本発明の一般式 [VII] で表される化合物又はその塩はシス、トランスどちらの異性体でもよく、また両異性体の混合物でもよい。

本発明で得られる一般式 [VII] で表される化合物の塩としては、医薬として許容される塩があり、例えばナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩が例示され、公知の方法にて変換することができる。

本発明者らは次に、式 [VIII] で表される 9-システイン-S-イル-2-オキソ-6, 12-ジチア-3, 14-ジアザテトラシクロ [9, 2, 1, 0 3, 7, 0 7, 1 1] テトラデカン-4-カルボン酸 (以下、tCD と称す) がシクロペンテノンとシステインとの反応により生成し、この tCD を単離することに成功し、本発明を完成した。

即ち、本発明によりシクロペンテノン又はその光学活性体と、システインを反応させることを特徴とする tCD 若しくはその光学活性体、又はそれらの塩の製造方法が提供される。

シクロペンテノン又はその光学活性体とシステインとが反応し、生成した tCD、その各ジアステレオマー若しくはその光学活性体、又はそれらの塩はがん細

胞増殖抑制活性を有し、この活性を指標に t CD、その各ジアステレオマー若しくはその光学活性体、又はそれらの塩を反応液中から精製、単離することができる。精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良く、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組み合わせ、反応物中の t CD、その各ジアステレオマー若しくはその光学活性体、又はそれらの塩を精製、単離することができる。

例えばシクロペンテノンと L-システィンを 37°C で 1 晩反応させることにより、反応液中に式 [VIII] で表される t CD が生成し、この化合物を含有する反応物の逆相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、t CD を精製、単離することができる。

t CD の塩としては、医薬として許容される塩があり、例えば塩酸塩、硫酸塩、酢酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩が例示され、公知の方法にて変換することができる。

式 [I]、式 [II]、一般式 [III]、式 [IV]、式 [V]、一般式 [VI]、一般式 [VII] 又は式 [VIII] で表されるアポトーシス誘発用物質（以下、本発明の化合物と称す）若しくはその光学活性体、又はそれらの塩より選択される化合物は制がん活性、がん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性、トポイソメラーゼ II 阻害活性、がん細胞分化誘導活性、抗リウマチ活性、慢性関節リウマチ抑制作用、ファス抗原産生誘導活性、抗菌活性、抗ウイルス活性、肝機能改善活性、熱ショックタンパク誘導活性、血液成分正常化活性、がん免疫増強活性、抗炎症活性、腫瘍壞死因子産生抑制活性、一酸化窒素産生抑制活性、免疫調節活性、例えば遅延型過敏反応抑制活性、リンパ球幼若化反応抑制活性、混合リンパ球反応抑制活性、IgE 産生抑制活性、カラゲーナン浮腫抑制活性等の生理活性を有し、これらの活性により、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分として含有する医薬は、例えば生体防御機構に作用する医薬、例えば抗体産生機構に作用する製剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、抗リウマチ剤、インターフェロン誘発剤等、糖質代謝

に作用する医薬、例えば糖尿病治療剤、病原生物に作用する医薬、例えば、抗菌剤、抗ウイルス剤等として有用である。従って本発明で得られる医薬は、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩に感受性を示す疾病用の医薬組成物として、例えばがん、ウイルス性疾患、リウマチ、糖尿病、アレルギー、自己免疫疾患、炎症等の疾病的治療用医薬組成物又は予防用医薬組成物として極めて有用である。

種々の生理作用を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ本発明の医薬組成物を製造することができる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、例えばヒト前骨髓性白血病細胞 H L - 6 0、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞 M O L T - 3、肺がん細胞 A - 5 4 9、S V 4 0 形質転換肺細胞 W I - 3 8 V A 1 3、肝がん細胞 H e p G 2、結腸がん細胞 H C T 1 1 6、ヒト結腸がん細胞 S W 4 8 0、ヒト結腸がん細胞 W i D r、胃がん細胞 A G S、ミエローマ細胞等のがん細胞に細胞増殖抑制作用、制がん活性を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は制がん剤の有効成分として使用することができる。また、これらの化合物はがん細胞にアポトーシス誘発作用を有する。本発明の化合物若しごくはその光学活性体又はそれらの塩のがん細胞増殖抑制作用機作は本発明を何ら制限するものではないが、例えばがん細胞に対するアポトーシス誘発作用、トポイソメラーゼ II 阻害作用も本発明の制がん作用に包含される。

制がん作用を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は一般的には、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前

に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターク、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤滑剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の医薬組成物の有効成分である本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明の制がん剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

制がん剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物の量が成人1日当たり $0.1\text{ }\mu\text{g} \sim 200\text{ mg/kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は制がん作用を有するが、低濃度ではがん細胞の分化誘導能を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はがん細胞の分化誘導剤（脱がん剤）としても有用である。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とするがん細胞分化誘導剤は、上記制がん剤に準

じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

上記がん細胞分化誘導剤はがん細胞分化誘導方法に使用することができる。すなわち本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として使用することによりがん細胞を分化させることができ、該方法はがん細胞の分化誘導機構の解明、分化誘導剤のスクリーニング等に有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗菌作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗菌剤を製造することができる。当該製剤は上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。またエタノール、グリシン、酢酸ナトリウム、アスコルビン酸、グリセリン脂肪酸エステル、食塩、E D T A等の他の抗菌性物質と組合せて使用しても良い。

本発明のアポトーシス誘発剤は、アポトーシス誘発性を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

アポトーシス誘発剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物の量が成人1日当たり0.1μg～100mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

なおアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死であると考えられている。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化さ

れ、この遺伝子を基にプログラム死遺伝子タンパク質が生合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

本発明のアポトーシス誘発剤は、このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現させることができ、不要若しくは病原細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて有用なものである。

本発明のアポトーシス誘発剤はアポトーシス誘発方法に使用することができる。すなわち本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分として使用することによりアポトーシスを誘発させることができ、該方法はアポトーシス誘発機構の解明、アポトーシス誘発剤、アポトーシス誘発阻害剤のスクリーニング等に有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗リウマチ作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗リウマチ剤を製造することができる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は関節炎等への抗炎症作用、カラゲナン浮腫抑制作用、腫瘍壞死因子産生抑制作用、インターロイキン - 10 産生増強作用、一酸化窒素産生抑制作用、ファス抗原産生誘導作用、免疫調節作用、例えば遅延型過敏反応抑制作用、リンパ球幼若化反応抑制作用、混合リンパ球反応抑制作用、IgE 産生抑制作用等の多様な生理活性を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分とする抗炎症剤又は炎症予防剤、腫瘍壞死因子産生抑制剤又は腫瘍壞死因子産生予防剤、インターロイキン - 10 産生増強剤、免疫調節剤、一酸化窒素産生抑制剤、ファス抗原産生誘導剤、免疫調節剤、IgE 産生抑制剤、遅延型過敏反応抑制剤、抗アレルギー剤等の医薬を上記抗リウマチ剤に準じ製剤化することができ、上記医薬に準じた方法で投与することができる。

リウマチは骨膜細胞や軟骨細胞に障害が起こる自己免疫疾患であり、本発明の抗アレルギー剤は自己免疫疾患治療剤としても有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は慢性関節リウマチな

どの臓器特異自己免疫疾患や炎症性疾患において、炎症を直接惹起していると考えられる、腫瘍壞死因子の産生を抑制し、Th1 抑制サイトカインであるインターロイキン-10の産生を増強する。したがって炎症、例えば臓器特異自己免疫疾患であるリウマチ、特に慢性関節リウマチの症状が改善され、炎症マーカーであるC反応タンパク（C R P）値、リウマトイド因子（r he u m a t o i d f a c t o r : R F）値、赤血球沈降速度（血沈）値が激減し、歩行困難等の合併症状も顕著に改善される。

腫瘍壞死因子は、腫瘍部位に出血性壞死を誘導する因子として発見されたが、現在では炎症を基本とした生体防御・免疫機構に広くかかわるサイトカインとして認識されている。この腫瘍壞死因子の産生調節機構の破綻は様々な不都合を宿主にもたらし、腫瘍壞死因子の過度又は未調節の産生は、慢性関節性リウマチ、リウマチ性脊髄炎、変形性関節症、痛風性関節炎、敗血症、敗血性ショック、内毒素ショック、グラム陰性菌敗血症、毒性ショック症候群、脳性マラリア、慢性肺炎、移植片対宿主反応、同種移植片拒絶反応、インフルエンザのような感染症による発熱及び筋肉痛、感染又は悪性腫瘍に対して二次的な悪液質、ヒト後天性免疫不全症候群（A I D S）に対して二次的な悪液質、A I D S、A I D S関連症候群、ケロイド形成、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、自己免疫糖尿病及び全身エリテマトーデス等の自己免疫疾患を含む、これらの多くの疾患に関連している〔モレキュラー メディシン（Molecular Medicine）、第33巻、第1010～1020頁、第1182～1189頁（1996）〕。本発明の腫瘍壞死因子産生抑制剤は、腫瘍壞死因子により媒介されるか又は悪化する病状の治療に有用である。また本発明により、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として使用する腫瘍壞死因子の産生の調節方法が提供される。

一酸化窒素（以下、NOと略す）は内皮細胞由来血管平滑筋弛緩因子（E D R F）の本体である〔ネーチャー（N a t u r e）、第327巻、第524～526頁（1987）〕。本発明により本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有する

N O 產生の抑制を必要とする疾病治療用医薬又は疾病予防用医薬が提供される。本発明において、N O 產生の抑制を必要とする疾病とは、特に限定はないが、例えば毒性ショックやある種のサイトカインによる治療等による全身性血圧低下、血圧応答低下、自己免疫疾患、炎症、関節炎、リウマチ性関節炎、糖尿病、炎症性腸疾患、血管機能不全、病因性血管拡張、組織損傷、心臓血管系虚血、痛感過敏症、脳虚血、血管新生を伴う疾病、がん等があり、特表平9-504524号、特表平9-505288号、特表平8-501069号、特表平8-512318号、特表平6-508849号の各公報に記載の疾病を含むものである。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有するN O 產生抑制剤はN O 產生機構研究、N O 作用機作研究に有用であり、またN O 產生機構に関する物質のスクリーニングに使用することもできる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はN O 產生細胞に対してN O 產生抑制作用を示す。例えば、マクロファージ細胞株にエンドトキシン（リポポリサッカライド：L P S）を添加すれば誘導型N O 合成酵素（N O S）が発現してN O が培地中に分泌されるが、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の共存下でL P S を作用させるとN O 產生は抑えられる。L P S 処理でN O 產生を誘導した場合、N O の細胞障害活性によって細胞生存率は低下するが、L P S 処理時に本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を添加するとN O の產生が低下し、細胞に対する障害も減少する。

固体がんの増大に血管新生は必須であるが、血管内皮増殖因子／血管透過性亢進因子（V E G F）はこの過程に重要な役割を演じている。様々なかん細胞においてV E G F がN O によって誘導される。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はN O 產生を抑制することによってがん細胞のV E G F 產生も抑制し、その結果、がん組織周辺での血管新生が阻害される。がん細胞を皮下に移植して固体腫瘍を形成させたマウスに本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与するとがん組織の周辺の血管の形成が不十分となり、がんは脱落する。

ニトロソアミンは2級アミンにニトロソ基が付加した一群の化合物で数百種類が知られており、その多くがDNAに損傷を加えることにより動物に対して発がん性を示す。ニトロソアミンはヒトの発がんにも深く関わっているとされており、通常胃の中で亜硝酸塩とアミンが反応することによって生成する。NOはpH中性の生理的条件下でもアミンと反応してニトロソアミンを生成する。また、医学的にがんとの関係が高い肝吸虫感染患者や肝硬変患者においてNO産生は亢進している。したがって本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与してNO産生の亢進を防ぐことによって特にハイリスクグループの発がんを予防することができる。以上のように、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は発がんの抑制とがん組織における血管新生阻害という2段階で制がん作用を示す。

NOはまた、炎症性病変に特徴的に認められる浮腫、すなわち血管透過性亢進作用を誘発し〔マエダ(Maeda)ら、ジャパニーズ ジャーナル オブ カンサー リサーチ (Japanese Journal of Cancer Research)、第85巻、第331～334頁(1994)〕、また、炎症性メディエーターであるプロスタグランジン類の生合成を亢進させる〔サルベミニ(Salvemini)ら、Proceedings of National Academy of Sciences, USA、第90巻、第7240～7244頁(1993)〕。一方、NOはスーパーオキシドラジカルと速やかに反応してパーオキシナイトライトを生じ、パーオキシナイトライトが炎症性の細胞、組織障害を引き起こすとも考えられている。

活性化された免疫細胞が臓器に入り込みサイトカインを放出するとNOの産生が誘導される。インスリン依存型糖尿病は膵島 β 細胞が特異的に破壊されることによって引き起こされる疾患であり、NOによる破壊であるとされている。また、慢性関節性リウマチ、変形性関節リウマチ、痛風性関節炎、ペーチェット病に伴う関節炎の患者の病変部の関節液には同患者の正常な関節や健常人の関節の関節液に比べて高濃度のNOが含まれている。これらの患者に本発明の化合物若し

くはその光学活性体又はそれらの塩を投与すると病変部におけるNO産生を抑制し、症状が改善する。

脳虚血中及び再灌流後にはNO産生が増大し、それに伴って脳組織が損傷を受ける。脳虚血時に患者に本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与することにより脳組織の損傷が軽減され、予後が改善される。

fas抗原 (APO-1抗原、CD95) と呼ばれる細胞表面抗原はアポトーシスを誘導する分子として注目されている [セル (Cell) 、第66巻、第233～243頁 (1991) 、ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディスン (J. Exp. Med.) 、第169巻、第1747～1756頁 (1989) 、ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem.) 第267巻、第10709～10715頁 (1992) 、ジャーナル オブ イムノロジー (J. Immunology) 、第184巻、第1274～1279頁 (1992)]。

fas抗原は、胸腺細胞、T細胞、細胞傷害性T細胞、B細胞あるいはNK細胞等の免疫系細胞に発現している。免疫系は外来の非自己抗原の侵入に際しては、免疫反応を惹起して非自己抗原を排除する。しかしながら、自己抗原に対しては免疫反応を示さず自己寛容が成立している。これは自己反応性を有するリンパ球系幹細胞が、クローン除去というネガティブセレクションを受けアポトーシスによる細胞死により排除されることによる。しかしながらfas抗原の遺伝子的欠陥等の生体の何らかの異常によりこれらの細胞がアポトーシスを受けなかった場合には、例えば自己反応性T細胞が末梢に蓄積される。また正常な生体においては、免疫担当細胞であるB細胞についても自己寛容が成立しており、この自己反応性B細胞も通常、アポトーシスにより死に至るが、自己反応性B細胞がfas抗原の遺伝子的な欠陥等の異常によりアポトーシスを受けなかった場合には、自己反応性B細胞が末梢に蓄積される。更に、関節リウマチの場合には、上記の自己反応性リンパ球の異常、滑膜細胞のターンオーバーの異常が病因の一端となっている。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なく

とも 1 以上の化合物を有効成分とするファス抗原産生誘導剤は自己反応性リンパ球、ターンオーバーの異常により生体から排除され得なかつた不用の生体構成細胞のアボトーシス誘導に有用であり、ファス抗原産生誘導方法に使用することができる。また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分として含有するファス抗原産生誘導剤はファス抗原産生異常を伴う疾病的予防剤又は治療剤として有用である。本発明においてファス抗原産生異常を伴う疾病とは、特に限定は無いが、例えば自己反応性 T 細胞、自己反応性 B 細胞により惹起される自己免疫疾患、関節リウマチ等が例示され、WO 97/0965 公報に記載の疾病を含むものである。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はインターロイキン-10 産生増強作用、遅延型過敏反応抑制作用、リンパ球幼若化反応抑制作用、混合リンパ球反応抑制作用、IgE 産生抑制作用、カラゲナン浮腫抑制作用等の免疫調節作用を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分とする免疫調節剤はこれらの免疫系、免疫因子の異常が起因となる疾病的治療剤又は予防剤として有用である。

すなわちインターロイキン-10 の産生低下により Th1 が活性化され、Th1 優位な自己免疫の炎症が惹起される。この炎症は腎炎、肝炎等臓器特異的自己免疫疾患、及び移植片拒絶反応やアレルギー性接触性皮膚炎等の疾患に関与している。本発明の免疫調節剤はインターロイキン-10 の産生を増強させ、Th1 の活性を抑制することにより、これらの疾患の治療又は予防に有用である。

またリンパ球幼若化反応とは、マイトジエンがリンパ球表面の受容体に結合し、リンパ球を活性化させ、その分裂、増殖を促す反応である。混合リンパ球反応とは、同種異系の動物より得られたリンパ球を混合培養することにより、主要組織適合抗原の不一致によるリンパ球の活性化が誘導され、リンパ球の分裂、増殖が促進される反応である。上記免疫調節剤はこれらの反応を抑制し、リンパ球の異常亢進が起因となる自己免疫性疾患、例えば慢性腎炎、慢性大腸炎、I 型糖尿病、慢性関節リウマチ等の慢性の疾患の治療又は予防に特に有用であり、また移植片拒絶反応の抑制においても有用である。

カラゲナン足浮腫モデルは、起炎剤であるカラゲナンを足蹠部に皮下注射することにより、マクロファージ、好中球等の炎症細胞が誘導され、これらの細胞から產生された炎症性の因子により血管透過性が亢進し、浮腫が惹起される反応である。上記免疫調節剤の浮腫抑制作用は、血管透過性の亢進の制御を必要とする疾患、例えば慢性関節リウマチの治療又は予防に有用である。

喘息やアトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー疾患においてはマスト細胞からのケミカルメディエーターの放出がアレルギー反応において大きな役割を果たす。この反応は IgE が細胞膜上のレセプターに結合し、架橋することによって惹起され、本発明の免疫調節剤は IgE の產生を抑制し、 IgE 產生により媒介されるか悪化する症状、例えば IgE が起因となるアレルギー疾患、例えば気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、じん麻疹、アナフィラキシーショック等の症状改善及び／又は疾患予防に極めて有用である。また本発明の免疫調節剤は遅延型過敏反応を抑制し、遅延型過敏反応を伴う疾病、例えば接触性過敏症、アレルギー性接触性皮膚炎、細菌アレルギー、真菌アレルギー、ウイルスアレルギー、薬物アレルギー、甲状腺炎、アレルギー性脳炎等の治療、予防において有用である。

近年、糖尿病の病理研究結果より、正常な脂肪細胞は全身でのインスリン作用が正常に行われるための重要な役割を果たし、糖代謝を円滑に進めるためには、正常な脂肪細胞が必要とされる〔実験医学、第 14 卷、第 61 ~ 68 頁 (1996)〕。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は前駆脂肪細胞、例えば線維芽前駆細胞の分化誘導能を有し、該細胞を脂肪細胞へ分化誘導する。そこで、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物を摂取することにより、正常な脂肪細胞が増加し、糖尿病の症状が改善される。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は血糖低下作用を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも 1 以上の化合物を有効成分とする糖尿病治療剤又は予防剤を作製することが

できる。

すなわち、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば糖尿病治療剤又は予防剤を製造することができる。当該製剤は上記制がん剤に準じ製剤化することができ、上記医薬に準じた方法で投与することができる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は高脂血症改善作用、すなわち血清トータルコレステロール低下作用、血清トリグリセリド低下作用、血清遊離脂肪酸低下作用を有し、これらの作用を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば高脂血症治療剤又は高脂血症予防剤を製造することができる。当該製剤の製造は上記糖尿病治療剤又は予防剤に準じ行えば良く、また糖尿病治療剤又は予防剤に準じた方法で投与することができる。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩の含有物を摂取することにより、高脂血症が改善され、血中脂質量が激減する。

また前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導能を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導剤を製造することができる。当該製剤の製造は上記糖尿病治療剤又は予防剤に準じ行えば良く、また糖尿病治療剤又は予防剤に準じた方法で投与することができる。

また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は腫瘍壞死因子産生抑制作用を示し、腫瘍壞死因子が原因となるインスリン非依存型糖尿病〔ネーチャー(Nature)、第389巻、第610～614頁(1997)〕の治療、予防に有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗ウイルス作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗ウイルス剤を製造することができる。抗ウイルス剤の製造は上記制がん剤に準じ製剤化することができ、上記医

薬に準じた方法で投与することができる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、D N A ウィルス、R N A ウィルス、レトロウィルス、及びウイロイドに対して抗ウイルス活性を示す。

従って、ヒト用抗ウイルス剤、非ヒト動物用抗ウイルス剤、例えば家畜、家禽、養殖動物、例えば魚類、エビ類等のウイルス病に有効な抗ウイルス剤、植物用抗ウイルス剤、例えば花卉類、野菜類等の農園芸作物のウイルス病に有効な抗ウイルス剤等、有用生物用の抗ウイルス剤として使用することができる。

本発明の抗ウイルス剤を鳥類に注射するか又は飼料若しくは飲料水に添加する等の獣医学、飼育術において周知の方法によって、マーレック氏病等の鳥類のウイルス性疾患が本発明に使用する化合物によって、予防及び／又は治療される。またプール、水槽、保持タンク又は飼育領域の水、海水等に直接、本発明に使用する化合物を添加するか、又は飼料中に本発明に使用する化合物を混合して、ウイルス感染によるプール、水槽、保持タンク又は飼育領域中の狭い区域に棲息する魚のウイルス病を同様に予防及び／又は治療し得る。

本発明の抗ウイルス剤が投与された非ヒト動物はその健康保持により、生存率、成長率、産卵率等の改善が顕著である。

本発明で使用する本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はこれらのウイルスタンパクの合成を抑制し、ウイルスゲノムの合成も抑制することにより、強い抗ウイルス作用を示す。またこれらのウイルス感染細胞を選択的に死滅させる。

例えばヒト後天性免疫不全ウイルス（以下HIV と略記する）の感染患者においても、すべてのCD4 陽性細胞にHIV が感染しているのではなく、一部の細胞にのみ感染している。本発明の抗ウイルス剤は、この感染細胞のHIV 増殖を抑制しながら選択的に感染細胞を死滅させ、未感染細胞にウイルス抵抗能を誘導し、細胞からのHIV の除去が可能となる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は肝機能改善作用、熱ショックタンパク誘導作用を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又は

それらの塩から選択される 1 以上の化合物を有効成分とする肝機能改善剤や熱ショックタンパク誘導剤を、上記抗ウイルス剤に準じ、製剤化することができ、抗ウイルス剤に準じた方法で投与することができる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩を摂取することにより、肝機能障害も改善され、GOT、GPT 値が正常化する。

また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は 70 kダルトン (HSP70) 等の熱ショックタンパク誘導活性を有し、肝炎ウイルス、エイズウイルス、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ヘルペスウイルス等の RNAウイルス、DNAウイルスに対する抗ウイルス作用を有する。また、熱ショックタンパクはがん免疫に関与しており、これらの化合物はがん免疫にも有効である。更に抗炎症等生体防御作用をも有する。本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は高い熱ショックタンパク誘導作用を持つことから、DNAウイルス、RNAウイルス、レトロウイルス、及びウイロイドに対して抗ウイルス活性を示す。これらのウイルス、ウイロイドには上記の各ウイルス、ウイロイドが例示される。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はがん遺伝子で形質転換されたがん細胞に対しても増殖抑制活性を有し、がん遺伝子による発がんを防止する作用を有する。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は HPV16 型のがん遺伝子 E7 によってがん化した細胞に対し、増殖抑制効果を有し、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として、ウイルス発がん細胞増殖抑制剤を提供することができ、がん遺伝子による発がんを防止することができる。

また本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はイニシエーターとプロモーターによる 2 段階発がんの抑制作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として、化学発がん抑制剤を提供することができる。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩は I gE 産生抑制作用

、遅延型過敏反応抑制作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗アレルギー剤を製造することができる。当該製剤の製造は、上記抗制がん剤に準じ、製剤化することができる。また、本発明の抗アレルギー剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として IgE 產生抑制剤、遅延型過敏反応抑制剤を製造することができる。これらの製剤は上記抗アレルギー剤に準じ製剤化することができ、上記抗アレルギーに準じた方法で投与することができる。

本発明の抗アレルギー剤は IgE の產生を抑制し、IgE 產生により媒介されるか悪化する症状、例えば IgE が起因となるアレルギー疾患、例えば気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アレルギー性結膜炎、じん麻疹、アナフィラキシーショック等の症状改善及び／又は疾患予防に極めて有用である。また遅延型過敏反応を抑制し、遅延型過敏反応を伴う疾病、例えば接触性過敏症、アレルギー性接触性皮膚炎、細菌アレルギー、真菌アレルギー、ウイルスアレルギー、薬物アレルギー、甲状腺炎、アレルギー性脳炎等の治療、予防において有用である。

本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はこれらの生理活性の有効量をマウスに単回経口投与しても死亡例は認められない。

以上、本発明の化合物若しくはその光学活性体又はそれらの塩はその種々の生理的機能により、医薬の分野において極めて有用な化合物である。

実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

実施例 1

(1) 10 g の D-グルクロン酸（シグマ社製 G 5269）を 1 リットルの水に溶解し、121°Cで 4 時間加熱した後約 10 ml になるまで減圧下濃縮した

。これに酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 混合液の上層 40 ml を加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約 10 ml まで濃縮した。

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲル BW-300SP (2 × 28 cm、富士シリシア化学社製) にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 の上層を溶離液としてコンプレッサーで 0.2 kg/cm² に加圧し、毎分 5 ml の流速で分離を行った。1 画分当たり 10 ml になるようにフラクションを行い、各画分の一部をとて薄層クロマトグラフィーで分析したところ 61 番から 80 番までの画分に高純度の (±)-シクロペンテノンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後 40 ml のクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって 100 mg の (±)-シクロペンテノンを得た。

この画分をパルパックタイプ S カラムを用いた順相 HPLC で分離し、215 nm の紫外線吸収で検出したところ、純度は 98 % であった。

(2) シクロペンテノンとイミダゾールとの反応

100 mM シクロペンテノン、500 mM イミダゾール水溶液 (pH 7.4) を 37 °C で 1 時間放置し、200 μl を以下の逆相 HPLC で分離した。

カラム：TSK gel ODS-80Ts (20 mm × 250 mm、東ソー社製)

ガードカラム：TSK guard column ODS-80Ts (20 mm × 50 mm、東ソー社製)

移動相：0.1% トリフルオロ酢酸水溶液

流速：9 ml / 分

検出：215 nm における吸光度

14.75 分のピークを分取し、減圧下乾固してイミダゾリルシクロペンテノンを得た。

その結果を図 1 に示す。すなわち図 1 はイミダゾリルシクロペンテノンの逆相 HPLC での溶出パターンを、溶出時間と 215 nm における吸光度の関係で示す図であり、横軸は溶出時間 (分)、縦軸は 215 nm における吸光度を示す。

実施例 2

実施例 1 で単離したイミダゾリルシクロペンテノンの高速原子衝撃質量分析 (FAB-MS) を DX 302 質量分析計 (日本電子社製) を用いて行った。また、重水に溶解し、核磁気共鳴法 (NMR) によってその構造を解析した。核磁気共鳴装置は JNM-A500 (日本電子社製) を用いた。紫外 (UV) 吸収スペクトルを UV-2500 分光光度計 (島津製作所製) を用いて測定した。赤外 (IR) 吸収スペクトルを拡散反射法によって測定した。その結果を以下に示す。

FAB-MS : m/z 165 [M+H]⁺

マトリックスとしてグリセロールを用いた。

¹H-NMR :

δ 2.45 (1H, d, $J = 19.5$, 5-H)、3.05 (1H, dd, $J = 6.5$, 19.5 Hz, 5-H)、5.56 (1H, m, 4-H)、6.44 (1H, m, 3-H)、7.30 (1H, d, $J = 1.0$, イミダゾール 4-H 又は 5-H)、7.39 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, イミダゾール 4-H 又は 5-H)、8.65 (1H, s, イミダゾール 2-H)

但し、HOD の化学シフト値を 4.65 ppm として表した。

¹³C-NMR :

δ 41.6 (5-C)、55.3 (4-C)、120.8 (イミダゾール 4-C 又は 5-C)、121.1 (イミダゾール 4-C 又は 5-C)、125.7 (3-C)、134.8 (イミダゾール 2-C)、157.2 (2-C)、202.9 (1-C)

但し、ジオキサンの化学シフト値を 67.4 ppm として表した。

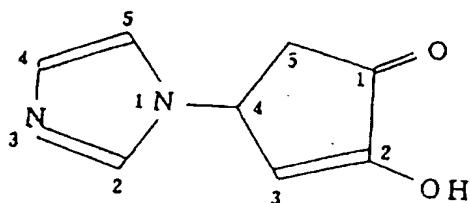
UV : λ_{max} 208, 245 nm (水)

IR : ν^{KBr}_{max} cm⁻¹ 3100, 2846, 1722, 1633, 1573, 1299, 1085

以上の結果を図 2～図 6 に示す。すなわち図 2 はイミダゾリルシクロペンテノンのマススペクトルを示す図であり、横軸は m/z 値、縦軸は相対強度 (%) を示す。図 3 はイミダゾリルシクロペンテノンの ¹H-NMR スペクトルを示す図

であり、横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図4はイミダゾリルシクロペンテノンの¹³C-NMRスペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値 (ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図5はイミダゾリルシクロペンテノンのUV吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波長 (nm)、縦軸は吸光度を示す。図6はイミダゾリルシクロペンテノンのIR吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波数 (cm⁻¹)、縦軸は透過率 (%) を示す。

なお、¹H-NMR、¹³C-NMRにおけるシグナルの帰属の番号は式 [XIV] の通りである。



[XIV]

実施例3

実施例1-(2)で得たイミダゾリルシクロペンテノンの1000、500、250、125、62.5及び31.3 μg/ml水溶液、あるいは対照として水10 μlを96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに添加した。前骨髓性白血病細胞株HL-60 (ATCC CCL-240) を10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地に5×10⁴ 個/mlとなるように懸濁し、90 μlずつ上記マイクロタイタープレートの各ウェルに分注し、5% CO₂ 存在下37 °Cで48時間培養した。5 mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド(MTT; シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液10 μlを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロパノール100 μlを加えてよくかくはんし、590 nmにおける吸光度を測定した。

その結果、62.5 μg/mlイミダゾリルシクロペンテノン添加区分(終濃度6.25 μg/ml)において細胞の増殖が見られなかった。よって、イミダ

ブリルシクロベンテノンは $6.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度でH L - 6 0 細胞の増殖を完全に抑制することが明らかになった。

実施例 4

0.5 ml の 0.25 M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7.0) 、 10 ml の 10 mg/ml N-アセチルガラクトサミン (和光純薬社製、 013-12821) 水溶液、 0.1 ml の 50 mg/ml ガラクトースオキシダーゼ水溶液 [トレセル (Tressel) ら、 メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology) 、 第 89 巻、 第 163~171 頁 (1982) 、 の方法により調製した] 、 0.5 ml の 2.35 単位/ml カタラーゼ (ベーリンガー・マンハイム社製、 106 810) 水溶液を混合し、 水を加えて 25 ml とした。この混合液を 37°C に保温し、 ベリスタポンプで空気を吹込みながら 16 時間反応させた。

2 M NaCl で洗浄後に水で平衡化した 20 ml のアンバーライト IRA-900 カラム (オルガノ社製) に上記反応物をアプライし、 非吸着画分を得た。

実施例 5

実施例 4 の非吸着画分を HCl で p H 3 に調整し、 121°C で 1 時間加熱した。本加熱処理液を滅菌水で 2、 4、 8、 16、 32 又は 64 倍希釈したものの H L - 6 0 細胞に対する増殖抑制活性を実施例 3 と同様の方法で測定した。

その結果、 細胞の増殖は、 加熱前の試料添加区分では対照の水添加区分と差が見られなかったのに対して、 1 時間加熱処理液の 2 倍希釈液添加区分では細胞増殖が完全に抑制されており、 8 倍希釈液添加区分では細胞増殖が約半分に抑制されていた。また顕微鏡観察によりアポトーシス小体の生成を確認した。

なお、 4 mg/ml N-アセチルガラクトサミン添加区分及び同濃度の N-アセチルガラクトサミンを p H 3 で 1 時間加熱した物を添加した区分の細胞増殖は対照の水添加区分と差が見られなかった。

以上より、 ガラクトースオキシダーゼ処理した N-アセチルガラクトサミンのアンバーライト IRA-900 カラム非吸着画分を加熱することによりがん細胞の増殖を抑制する物質が生成することが明らかになった。

実施例 6

実施例 4 の非吸着画分を凍結乾燥した後 25 ml の水に溶解し、HCl で pH 3 に調整して 121°C で 4 時間加熱した。本加熱処理液 40 μl を以下に示す逆相 HPLC で分離した。

カラム：TSKgel ODS-80TS (4.6 mm × 250 mm、東ソー社製)

流速：1 ml / 分

溶媒 A：0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA；メルク社製) 水溶液

溶媒 B：0.1% TFA、50% アセトニトリル水溶液

グラジェント：0 分 → 15 分 溶媒 A

15 分 → 45 分 溶媒 A → 溶媒 B

45 分 → 60 分 溶媒 B

検出：210 nm における吸光度

主要なピークとそれらの間の画分を分取して減圧下乾固した後、各画分を 40 μl の水に溶解したもの、及びこれらを水で 3 倍又は 9 倍希釈したものの HL-60 細胞に対する増殖抑制活性を実施例 3 と同様の方法で測定した。但し、各ウェルに 5 μl の試料を添加し、培養時間は 18 時間とした。その結果、保持時間 17.1 分のピーク水溶液添加区分とその 3 倍希釈液添加区分でがん細胞増殖抑制活性が見られた。またアポトーシス小体の生成を確認した。

図 7 にそのクロマトグラムを示す。図 7 は保持時間と 210 nm における吸光度の関係を表す図であり、横軸は保持時間 (分)、縦軸は 210 nm における吸光度を示す。

同様の逆相 HPLC を繰り返して保持時間 17.1 分のピークを分取して凍結乾燥し、がん細胞増殖抑制物質を単離した。

実施例 7

実施例 6 で単離した保持時間 17.1 分のピークのがん細胞増殖抑制物質の質量分析、核磁気共鳴法 (NMR) による構造解析、及び赤外 (IR) 吸収スペクトルの測定を行った。質量分析は DX302 質量分析機 (日本電子社製)、NMR

Rスペクトルの測定はJNM-A500(日本電子社製)、IRスペクトルの測定はFTIR-8000(島津製作所製)を用いて行った。その結果を以下に示す。

FAB-MS : m/z 184 [M+H]⁺、206 [M+Na]⁺

マトリックスはm-ニトロベンジルアルコールを用いた。

¹H-NMR :

δ 2.04 (3H, s, 9-H), 6.22 (1H, d, J = 9.0 Hz, 5-H)、6.60 (1H, d, J = 9.0 Hz, 6-H)、8.21 (1H, br-s, 3-OH)、8.71 (1H, br-s, 4-OH)、9.11 (1H, br-s, 2-OH)、9.48 (1H, br-s, 7-H)

試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、残存ジメチルスルホキシドの化学シフトを2.49 ppmとして表した。

¹³C-NMR :

δ 23.0 (9-C)、106.3 (5-C)、112.7 (6-C)、119.0 (1-C)、134.3 (3-C)、138.5 (2-C)、143.3 (4-C)、169.1 (8-C)

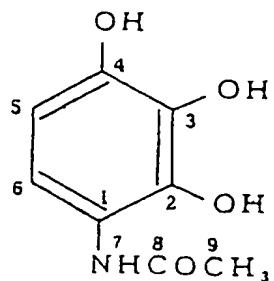
試料は重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフトを39.5 ppmとして表した。

IR : $\nu_{\text{KBr max}} \text{ cm}^{-1}$ 3423, 1641, 1500, 1205, 1024

以上の結果から、がん細胞増殖抑制物質は式〔II〕で示される構造を持つN-(2, 3, 4-トリヒドロキシフェニル)アセトアミドであることが明らかになった。

図8にそのマススペクトルを示し、横軸はm/z値、縦軸は相対強度(%)を示す。図9にその¹H-NMRスペクトルを示し、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図10にその¹³C-NMRスペクトルを示し、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図11にそのIRスペクトルを示し、横軸は波数(cm^{-1})、縦軸は透過率(%)を示す。

なお、¹H-NMR、¹³C-NMRにおけるシグナルの帰属の番号は下記式〔XV〕の通りである。



〔XV〕

実施例 8

(1) 50 mM D-グルクロン酸、500 mM グリシン（共にナカライトスク社製）水溶液を1N HClでpH 3に調整し、121°Cで30分間加熱した。

(2) 実施例8-(1)で得た加熱処理液3mlに5mlの1-ブタノール、3mlのエタノール及び0.05mlの酢酸を加えて混合し、本混合液のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを以下のようにして行った。

充てん剤：カラムクロマトグラフィー用シリカゲルBW-300SP（富士シリシア化学社製）

カラムサイズ：2.0 cm × 4.5 cm

移動相：1-ブタノール：エタノール：酢酸：水=5:3:3:0.05

ポンプで0.4 kgf/cm²の空気圧をかけて溶出した。最初の100mlを捨てた後、7.5mlずつフラクションを行った。25~28番目のフラクションを集め、減圧下濃縮乾固した後、200μlの水に溶解した。

(3) 実施例8-(2)で得た部分精製標品を以下の逆相HPLCによって更に精製した。

カラム：CAPCELL PAK C₁₈ SG300Å 5 μm (6×250 mm、資生堂社製)

移動相：0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

流速：1 ml/分

検出：215 nmにおける吸光度

30 μlの試料を注入し、保持時間6.9分の主要なピークを分取した。この操作を4回行った後、分取した液を減圧下乾固してB-UGを得た。

その結果を図12に示す。すなわち図12はB-UGの逆相HPLCにおける溶出時間と215 nmにおける吸光度の関係を示す図であり、横軸は溶出時間（分）、縦軸は215 nmにおける吸光度を示す。

実施例9

実施例8で単離したB-UGの高速原子衝撃質量分析（FAB-MS）をDX 302質量分析計（日本電子社製）を用いて行った。また、重水に溶解し、核磁気共鳴法（NMR）によってその構造を解析した。核磁気共鳴装置はJNM-A 500（日本電子社製）を用いた。紫外（UV）吸収スペクトルをUV-250 0分光光度計（島津製作所製）、赤外（IR）吸収スペクトルをFTIR-8000PC赤外分光光度計（島津製作所製）を用いて測定した。その結果を以下に示す。

FAB-MS : m/z 154 [M+H]⁺、176 [M+Na]⁺、
MW 153

マトリックスとしてグリセロールを用いた。

¹H-NMR :

δ 5.06 (2H, s, 7-H)、7.74 (1H, dd, J=6.0, 9.0 Hz, 5-H)、7.86 (1H,ddd, J=1.0, 2.5, 9.0 Hz, 4-H)、8.14 (1H, dd, J=1.0, 6.0 Hz, 6-H)、8.20 (1H, m, 2-H)

但し、HODの化学シフト値を4.65 ppmとして表した。

¹³C-NMR :

δ 62.8 (7-C)、129.2 (5-C)、133.4 (4-C)、134.6 (2-C)、137.9 (6-C)、157.3 (3-C)、170.6 (8-C)

但し、ジオキサンの化学シフト値を67.4 ppmとして表した。

UV : λ_{max} 290 nm (水)

IR : ν^{KBr} cm^{-1} 3100、1678、1499、1325、1198、721

以上より、B-UGは式 [XII] で表される1-カルボキシメチル-3-ヒドロキシピリジニウム内部塩であることが明らかになった。

その結果を図13～図17に示す。すなわち図13はB-UGのマススペクトルを示す図であり、横軸はm/z値、縦軸は相対強度(%)を示す。図14はB-UGの¹H-NMRスペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図15はB-UGの¹³C-NMRスペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図16はB-UGのUV吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波長(nm)、縦軸は吸光度を示す。図17はB-UGのIR吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波数(cm⁻¹)、縦軸は透過率(%)を示す。

なお、¹H-NMR、¹³C-NMRにおけるシグナルの帰属の番号は式[XVI]の通りである。



実施例10

- (1) 実施例1-(1)で得たシクロペンテノン6mgを1.5mlの10N HCl:メタノール=5:95に溶解し、37°Cで1晩反応させた。炭酸銀を加えて中和した後、遠心上清を減圧下乾固し、70μlの0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液に溶解した。この試料を以下の逆相HPLCで分離した。
- カラム：TSK gel ODS-80Ts (20mm×250mm、東ソー社製)

ガードカラム：T S K g u a r d c o l u m n O D S - 8 0 T s (2 0 ×
5 0 mm、東ソー社製)

溶媒A：0. 1% T F A水溶液

溶媒B：0. 1% T F A、5 0 %アセトニトリル水溶液

溶出：溶媒A（2 0 分間）→溶媒Aから溶媒Bへの直線濃度勾配（4 0 分間）

流速：9 m l / 分

検出：2 1 5 n mにおける吸光度

保持時間4 8. 5 8分の主要なピークが見られ、このピークを分取して減圧下乾固し、M C 2を得た。

(2) 実施例1 0 - (1) で得たM C 2を1 mM H C lに溶解し、3 7 °Cで1 6時間反応させた。この反応液を以下の逆相H P L Cで分離した。

カラム：T S K g e l O D S - 8 0 T s (4. 6 m m × 2 5 0 m m、東ソー
社製)

溶媒：0. 1% T F A水溶液

流速：1 m l / 分

検出：2 1 5 n mにおける吸光度

保持時間6. 6分の主要なピークが新たに見られたので分取し、減圧下濃縮乾固してH M C 2を得た。

(3) 実施例1 - (1) で得たシクロベンテノンを8. 6 m g / m lになるよう3 0 0 mM硫酸に溶解し、1 0 0 °Cで4時間反応させた。この反応物を実施例1 0 - (1) と同様の逆相H P L Cで分離し、保持時間6. 6分の主要なピークを分取した。

実施例1 1

(1) M C 2の質量分析をD X 3 0 2質量分析計（日本電子社製）を用いて行った。また、0. 1 N重塩酸に溶解し、J N M - A 5 0 0（日本電子社製）を用いて核磁気共鳴（N M R）スペクトルを測定した。紫外（U V）吸収スペクトルをU V - 2 5 0 0分光光度計（島津製作所製）を用いて測定した。赤外（I R）吸収スペクトルをF T I R - 8 0 0 0 P C赤外分光光度計（島津製作所製）を用い

て測定した。その結果を以下に示す。

FAB-MS : m/z 143 [M+H]⁺、165 [M+Na]⁺

マトリックスとしてm-ニトロベンジルアルコールを用いた。

¹H-NMR :

δ 2.23 (1H, dd, J=1.5, 19.0 Hz, 5-H)、2.72 (1H, dd, J=6.0, 19.0 Hz, 5-H)、3.26 (3H, s, 4-OCH₃)、3.61 (3H, s, 2-OCH₃)、4.52 (1H, m, 4-H)、6.52 (1H, d, J=3.0 Hz, 3-H)

但し、HODの化学シフト値を4.65 ppmとして表した。

¹³C-NMR :

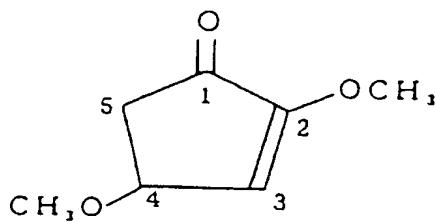
δ 40.8 (5-C)、56.7 (2-OCH₃)、58.4 (4-OCH₃)、74.7 (4-C)、127.3 (3-C)、159.0 (2-C)、203.9 (1-C)

但し、ジオキサンの化学シフト値を67.4 ppmとして表した。

UV : λ_{max} 247 nm (水)

IR : $\nu^{\text{KBr}}_{\text{max}}$ cm⁻¹ 1728、1631、1346、1120、1093、987

以上よりMC2は一般式〔VI〕においてR₃、R₄がメチル基である、2,4-ジメトキシ-2-シクロヘンテノン-1-オンであることが明らかになった。なお、¹H-NMR、¹³C-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式〔XVII〕の通りである。



〔XVII〕

(2) HMC2を0.1N重塩酸に溶解し、JNM-A500（日本電子社製）

を用いて核磁気共鳴（NMR）スペクトルを測定した。その結果を以下に示す。

¹H-NMR :

δ 2.13 (1H, dd, J = 1.5, 19.0 Hz, 5-H)、2.75 (1H, dd, J = 6.0, 19.0 Hz, 5-H)、2.76 (2H, t, J = 2.5 Hz, 4'-H)、4.78 (1H, m, 4-H)、6.10 (1H, t d, J = 2.5, 6.5 Hz, 2'-H)、6.40 (1H, d, J = 2.5 Hz, 3-H)、7.78 (1H, t d, J = 2.5, 6.5 Hz, 3'-H)

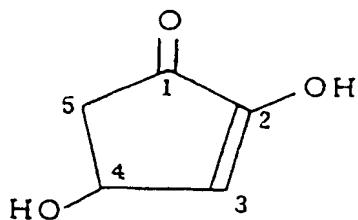
但し、HODの化学シフト値を4.65 ppmとして表した。

¹³C-NMR :

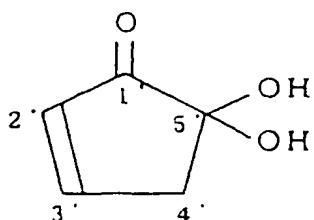
δ 43.2 (5-C)、44.7 (4'-C)、65.7 (4-C)、93.3 (5'-C)、130.0 (2'-C)、132.5 (3-C)、154.6 (2-C)、166.6 (3'-C)、205.4 (1-C)、207.3 (1'-C)

但し、ジオキサンの化学シフト値を67.4 ppmとして表した。

以上よりHMC2は0.1N重塩酸中において、式〔IV〕で表される2,4-ジヒドロキシー-2-シクロヘンテノン-1-オン及び式〔V〕で表される5,5-ジヒドロキシー-2-シクロヘンテノン-1-オンより成るモル比約2:1の組成物であることが明らかになった。なお、¹H-NMR、¹³C-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式〔XVIII〕及び下記式〔XIX〕の通りである。



〔XVIII〕



(3) 実施例 10 - (3) で得た保持時間 6.6 分の画分の NMR スペクトルを測定したところ実施例 11 - (2) の HMC2 と全く同じ結果が得られ、本画分の物質は式 [IV] で表される 2,4-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び式 [V] で表される 5,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンより成るモル比約 2 : 1 の組成物であることが明らかになった。

結果を図 18 ~ 図 24 に示す。すなわち図 18 は MC2 のマススペクトルを示す図であり、横軸は m/z 値を、縦軸は相対強度 (%) を示す。図 19 は MC2 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを、図 20 は MC2 の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルを示す図であり、図 19 と図 20 において横軸は化学シフト値 (ppm) を、縦軸はシグナルの強度を示す。図 21 は MC2 の UV スペクトルを示す図であり、横軸は波長 (nm) を、縦軸は吸光度を示す。図 22 は MC2 の IR スペクトルを示す図であり、横軸は波数 (cm^{-1}) を、縦軸は透過率 (%) を示す。図 23 は HMC2 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを、図 24 は HMC2 の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルを示す図であり、図 23 と図 24 において横軸は化学シフト値 (ppm) を、縦軸はシグナルの強度を示す。

実施例 12

実施例 10 で得た MC2 の 1 mM 水溶液と HMC2 の 350 μM 水溶液の HL-60 細胞に対する増殖抑制活性を実施例 3 と同様の方法で測定した。

その結果、1 mM MC2 添加区分（終濃度 100 μM ）と 350 μM HMC2 添加区分（終濃度 35 μM ）において細胞の増殖が抑制されており、光学顕微鏡によってアポトーシス小体が観察された。

実施例 13

(1) 500 ml の 30 mM D-グルクロン酸、30 mM チロシン（共にナカライトスク社製）水溶液を 1 N HCl で pH 3 に調整し、121°C で 4 時間加熱した。

(2) 実施例 13 - (1) で得た加熱処理液を酢酸エチルで抽出し、抽出液を減圧下濃縮して得た液を以下のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離した。

充てん剤：カラムクロマトグラフィー用シリカゲル BW-300 SP (富士シリシア化学社製)

カラムサイズ：2.0 cm × 45 cm

移動相：ヘキサン：酢酸エチル = 3 : 7

ポンプで 0.25 kgf/cm² の空気圧をかけて溶出した。最初の 40 ml を捨てた後、4 ml ずつフラクションを行った。6 ~ 11 番目のフラクションを集め、減圧下濃縮乾固した後、5 ml のヘキサン：酢酸エチル = 3 : 2 に溶解した。

この液のシリカゲルカラムクロマトグラフィーをヘキサン：酢酸エチル = 3 : 2 を移動相として上記と同様に行った。最初の 30 ml を捨てた後、6 ml ずつフラクションを行った。19 ~ 32 番目のフラクションを集め、減圧下濃縮乾固した後、1 ml の 50% アセトニトリル水溶液に溶解した。

(3) 実施例 13 - (2) で得た部分精製標品を以下の逆相 HPLC によって更に精製した。

カラム：CAPCELL PAK C₁₈ SG300A 5 μm (6 × 250 mm、資生堂社製)

流速：1 ml / 分

移動相 A : 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液

B : 0.1% TFA 含有 50% アセトニトリル水溶液

溶出（移動相 B の濃度）：55% (0 分 ~ 8 分) → 55% ~ 80% 直線濃度勾配 (8 分 ~ 13 分) → 100% (13 分以後)

検出：215 nm における吸光度

50 μlの試料を注入し、保持時間18.7分の主要なピークを分取した。この操作を19回行った後、分取した液を減圧下乾固して4.7mgのS-1127を得た。

その結果を図25に示す。すなわち図25は溶出時間と215nmにおける吸光度の関係を示す図であり、横軸は溶出時間(分)、縦軸は215nmにおける吸光度を示す。

実施例14

実施例13で単離したS-1127の高速原子衝撃質量分析(FAB-MS)をDX302質量分析計(日本電子社製)を用いて行った。また、重ジメチルスルホキシドに溶解し、核磁気共鳴法(NMR)によってその構造を解析した。核磁気共鳴装置はJNM-A500(日本電子社製)を用いた。紫外(UV)吸収スペクトルをUV-2500分光光度計(島津製作所製)、赤外(IR)吸収スペクトルをFTIR-8000PC赤外分光光度計(島津製作所製)を用いて測定した。その結果を以下に示す。

FAB-MS : m/z 253 [M-H]⁻

マトリックスとしてグリセロールを用いた。

¹H-NMR :

δ 3.54 (2H, d, J = 7.5 Hz, 4-H)、6.69 (2H, d, J = 8.5 Hz, 7-H)、6.80 (2H, d, J = 9.0 Hz, 11-H)、6.88 (1H, t, J = 7.5 Hz, 3-H)、6.97 (2H, d, J = 8.5 Hz, 6-H)、7.00 (2H, d, J = 9.0 Hz, 10-H)、9.25 (1H, s, 8-OH)、9.53 (1H, s, 12-OH)、9.58 (1H, s, 1-H)

但し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2.49 ppmとして表した。

¹³C-NMR :

δ 34.3 (4-C)、114.9 (11-C)、115.4 (7-C)、122.6 (9-C)、128.3 (5-C)、129.3 (6-C)、130.6

(10-C)、142.6(2-C)、154.1(3-C)、155.9(8-C)、157.0(12-C)、194.5(1-C)、

但し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を39.5 ppmとして表した。

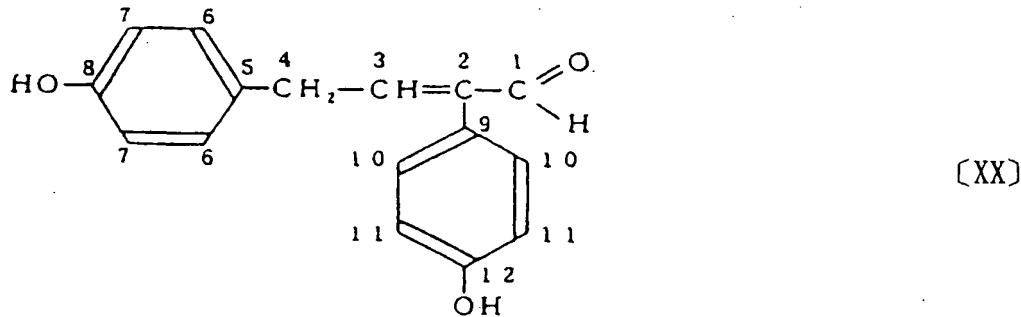
UV : λ_{\max} 225, 278 nm (メタノール)

IR : $\nu_{\text{KBr}}^{\max} \text{ cm}^{-1}$ 3294, 1672, 1610, 1514, 1228, 837

以上より、S-1127は式〔XIII〕で表される2,4-ビス(p-ヒドロキシフェニル)-2-ブテナールであることが明らかになった。

その結果を図26～図30に示す。すなわち図26はS-1127のマススペクトルを示す図であり、横軸はm/z値、縦軸は相対強度(%)を示す。図27はS-1127の¹H-NMRスペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図28はS-1127の¹³C-NMRスペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図29はS-1127のUV吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波長(nm)、縦軸は吸光度を示す。図30はS-1127のIR吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波数(cm⁻¹)、縦軸は透過率(%)を示す。

なお、¹H-NMR、¹³C-NMRにおけるシグナルの帰属の番号は式〔XX〕の通りである。



実施例 15

56°C、30分間処理したウシ胎児血清（ギブコ社製）を10%含む RPMI

1640培地（日水社製）にて37°Cで培養したHL-60細胞（ATCC CL240）を上記培地で 2.5×10^5 個/4.5mlとなるように懸濁した。この懸濁液に対して10μM、20μM、40μM又は80μM S-1127水溶液 0.5mlを添加し、5%炭酸ガス存在下、37°Cで15時間又は39時間培養した。

培養細胞をトリパンブルーで染色して生細胞数と死細胞数を計数したところ40μM以上のS-1127添加区分では15時間培養後には細胞が死滅しており、20μM S-1127添加区分では対照の水添加区分に比べて39時間培養後に生細胞数が顕著に減少していた。また、15時間培養後に細胞からDNAを抽出してアガロースゲル電気泳動を行ったところ、20μM以上のS-1127添加区分ではDNAの断片化が認められた。なお、対照の水添加区分においてはこの現象は観察されなかった。

その結果を図31に示す。すなわち図31はHL-60の培養液にS-1127を添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間（時間）、縦軸は培養液中の生細胞数（ $\times 10^5$ 個/5ml）を示す。図31中において白丸印（○）は10μM S-1127添加を、白三角印（△）は20μM S-1127添加を、白四角印（□）は40μM S-1127添加を、×印は80μM S-1127添加を、黒丸印（●）は水添加の対照を示す。

実施例16

1M シクロペンテノン水溶液 0.2mlと1M L-システイン塩酸塩（ナカライトスク社製、103-13）水溶液 1.8mlを混合し、37°Cで1晩反応させた。反応液のpHは約4であった。この反応液 $150\mu l$ を以下の逆相HPLCで分離し、保持時間28.7分及び29.1分のピークをまとめて分取した。

カラム：TSK gel ODS-80Ts (4.6mm × 250mm、東ソー社製)

移動相A：0.1% トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液

B : 0. 1 % TFA、 50 % アセトニトリル水溶液

溶出：移動相A（15分間）→移動相Aから移動相Bへの直線濃度勾配（15分間）→移動相B（15分間）

流速：1 ml/分

検出：215 nmにおける吸光度

この操作を11回繰り返し、減圧下乾固してLCDを得た。上記と同様の条件で再クロマトグラフィーを行い、28.7分のピークからLCD1、29.1分のピークからLCD2を得た。

その結果を図32に示す。すなわち図32は溶出時間と215 nmにおける吸光度の関係を示す図であり、横軸は溶出時間（分）、縦軸は215 nmにおける吸光度を示す。

実施例17

実施例16で単離したLCD1とLCD2の高速原子衝撃質量分析（FAB-MS）をDX302質量分析計（日本電子社製）を用いて行った。また、重水に溶解し、核磁気共鳴法（NMR）によってその構造を解析した。核磁気共鳴装置はJNM-A500（日本電子社製）を用いた。LCD1の紫外（UV）吸収スペクトルをUV-2500分光光度計（島津製作所製）、赤外（IR）吸収スペクトルをFTIR-8000（島津製作所製）を用いて測定した。その結果を以下に示す。

LCD1

FAB-MS : m/z 404 [M-H]⁻

マトリックスとしてグリセロールを用いた。

¹H-NMR :

δ 2.05 (1H, dd, J = 4.0, 15.5 Hz, 10-H)、2.40 (1H, dd, J = 9.5, 13.0 Hz, 8-H)、2.61 (1H, dd, J = 8.0, 13.0, 8-H)、2.79 (1H, dd, J = 11.0, 15.5 Hz, 10-H)、3.05 (1H, dd, J = 7.0, 15.0 Hz, 1'-H)、3.10 (1H, d, J = 11.0 Hz, 5-H)、3.13 (1H

, d d, $J = 4.0, 15.0\text{ Hz}$, $1' - \text{H}$)、 3.19 (1 H , d d, $J = 6.0, 11.0\text{ Hz}$, $5 - \text{H}$)、 3.22 (1 H , d d, $J = 8.5, 12.5\text{ Hz}$, $13 - \text{H}$)、 3.40 (1 H , m, $9 - \text{H}$)、 3.50 (1 H , d d, $J = 8.5, 12.5\text{ Hz}$, $13 - \text{H}$)、 4.15 (1 H , d d, $J = 4.0, 7.0$, $2' - \text{H}$)、 4.30 (1 H , d, $J = 6.0\text{ Hz}$, $4 - \text{H}$)、 4.82 (1 H , t, $J = 8.5\text{ Hz}$, $1 - \text{H}$)

但し、HODの化学シフト値を 4.65 ppm として表した。

$^{13}\text{C-NMR}$:

$\delta 31.9$ ($13 - \text{C}$)、 32.1 ($1' - \text{C}$)、 37.7 ($9 - \text{C}$)、 40.9 ($10 - \text{C}$)、 41.9 ($5 - \text{C}$)、 47.0 ($8 - \text{C}$)、 53.1 ($2' - \text{C}$)、 61.8 ($1 - \text{C}$)、 63.1 ($4 - \text{C}$)、 83.8 ($7 - \text{C}$)、 88.7 ($11 - \text{C}$)、 171.0 ($4' - \text{C}$)、 171.4 ($3' - \text{C}$)、 173.7 ($2 - \text{C}$)

但し、ジオキサンの化学シフト値を 67.4 ppm として表した。

UV : 末端吸収 (水)

IR : $\nu^{\text{KBr}}_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ $2937, 1730, 1664, 1390, 1195, 1141$

LCD 2

FAB-MS : $m/z 404$ [$M - \text{H}$]

マトリックスとしてグリセロールを用いた。

$^1\text{H-NMR}$:

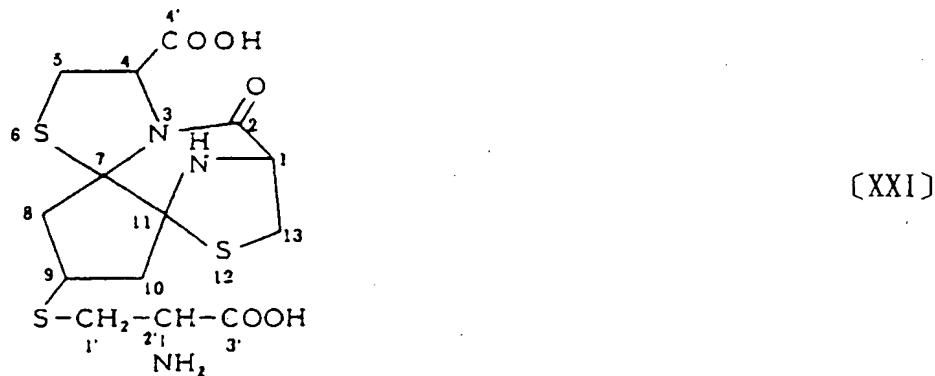
$\delta 2.25$ (2 H , m, $8 - \text{H}$, $10 - \text{H}$)、 2.63 (1 H , d d, $J = 8.0, 14.0$, $8 - \text{H}$)、 2.95 (1 H , d d, $J = 6.5, 14.5\text{ Hz}$, $10 - \text{H}$)、 3.04 (1 H , d d, $J = 7.0, 15.0\text{ Hz}$, $1' - \text{H}$)、 3.12 (1 H , d d, $J = 4.5, 15.0\text{ Hz}$, $1' - \text{H}$)、 3.12 (1 H , d, $J = 11.0\text{ Hz}$, $5 - \text{H}$)、 3.18 (1 H , d d, $J = 5.5, 11.0\text{ Hz}$, $5 - \text{H}$)、 3.26 (1 H , d d, $J = 8.5, 12.5\text{ Hz}$, $13 - \text{H}$)、 3.49 (1 H , d d, $J = 8.5, 12.5\text{ Hz}$, $13 - \text{H}$)、

3.63 (1 H, m, 9-H)、4.16 (1 H, dd, J = 4.5, 7.0, 2'-H)、4.29 (1 H, d, J = 5.5 Hz, 4-H)、4.85 (1 H, t, J = 8.5 Hz, 1-H)

但し、HODの化学シフト値を4.65 ppmとして表した。

その結果を図33～39に示す。すなわち図33はLCD1のマススペクトルを示す図であり、横軸はm/z値、縦軸は相対強度(%)を示す。図34はLCD1の¹H-NMRスペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図35はLCD1の¹³C-NMRスペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。図36はLCD1のUV吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波長(nm)、縦軸は吸光度を示す。図37はLCD1のIR吸収スペクトルを示す図であり、横軸は波数(cm⁻¹)、縦軸は透過率(%)を示す。図38はLCD2のマススペクトルを示す図であり、横軸はm/z値、縦軸は相対強度(%)を示す。図39はLCD2の¹H-NMRスペクトルを示す図であり、横軸は化学シフト値(ppm)、縦軸はシグナルの強度を示す。

なお、¹H-NMR、¹³C-NMRにおけるシグナルの帰属の番号は式[XXI]の通りである。



以上より、tCDは互いにジアステレオマーの関係にあるLCD1とLCD2の混合物であり、LCD1とLCD2は共に式[XXI]の平面構造で表されることが明らかになった。

実施例 1 8

注射剤

- (1) 生理食塩液（日本薬局法収載品）にイミダゾリルシクロベンテノンを1%濃度で加え注射剤を作製した。
- (2) 生理食塩水（前記と同じ）にイミダゾリルシクロベンテノン及びグリシルリチン酸をそれぞれ0.5%及び0.1%濃度で加え、注射剤を作製した。
- (3) 生理食塩液（前記と同じ）にtCDを1%濃度で加え注射剤を作製した。
- (4) 生理食塩水（前記と同じ）にtCD及びグリシルリチン酸をそれぞれ0.5%及び0.1%濃度で加え、注射剤を作製した。

他の本発明のアポトーシス誘発剤を用い、同様に注射剤を作成した。

実施例 1 9

錠剤

- (1) イミダゾリルシクロベンテノンの100mgと微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。
 - (2) イミダゾリルシクロベンテノンの0.1mg、グリシルリチン酸ジカリウム10mg及び微結晶セルロースの適量を含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。
 - (3) tCDの100mgと微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。
 - (4) tCDの0.1mg、グリシルリチン酸ジカリウム10mg及び微結晶セルロースの適量を含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。
- 他の本発明のアポトーシス誘発剤を用い、同様に錠剤を作成した。

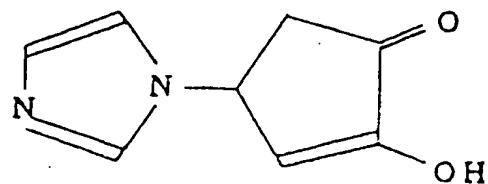
発明の効果

本発明により制がん活性、がん細胞増殖抑制活性、アポトーシス誘発活性、トポイソメラーゼII阻害活性、がん細胞分化誘導活性、抗リウマチ活性、慢性関節リウマチ抑制作用、ファス抗原産生誘導活性、抗菌活性、抗ウイルス活性、肝機能改善活性、熱ショックタンパク誘導活性、血液成分正常化活性、がん免疫増強

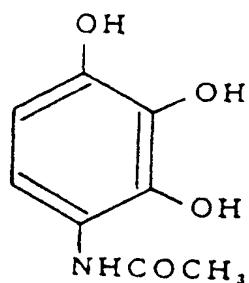
活性、抗炎症活性、腫瘍壞死因子産生抑制活性、一酸化窒素産生抑制活性、免疫調節活性、例えば遅延型過敏反応抑制活性、リンパ球幼若化反応抑制活性、混合リンパ球反応抑制活性、IgE産生抑制活性、カラゲーナン浮腫抑制活性等の生理活性を有する本発明の化合物若しくはその光学活性体、又はそれらの塩が提供され、かつ、本発明の化合物若しくはその光学活性体、又はそれらの塩を含有する生理活性機能を有する医薬組成物が提供される。

請求の範囲

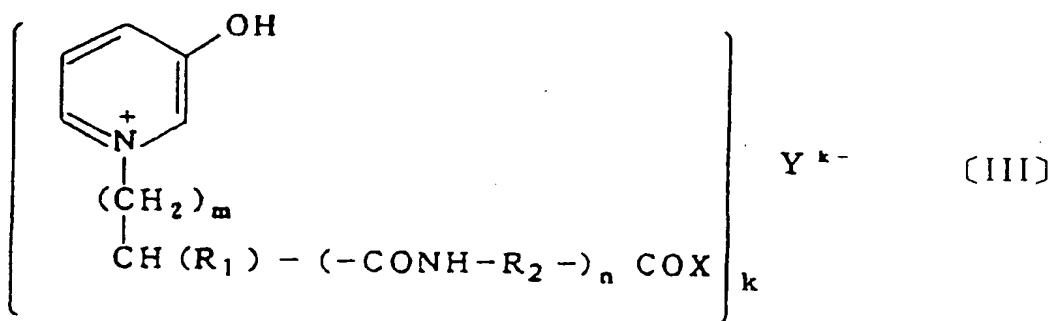
1. 下記式〔I〕、式〔II〕、一般式〔III〕、式〔IV〕、式〔V〕、一般式〔VI〕、一般式〔VII〕又は式〔VIII〕で表されるアボトーシス誘発用物質若しくはその光学活性体、又はそれらの塩。



〔I〕

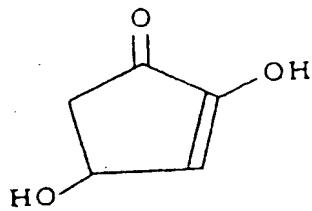


〔II〕

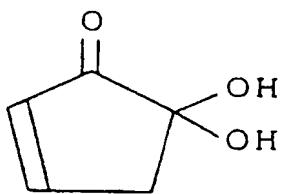


(式〔III〕中、 R_1 は H、アミノ基、若しくは低級アルキル基、又はアミノ酸における置換基を有する低級アルキル基を、 R_2 はアミノ酸におけるペプチド結合に関与するアミノ基とカルボキシル基を除いた 2 個の残基を、X は O^- 又はアミノ基を、 Y^{k-} は k 値の陰イオンを、m は 0 ~ 4 の整数を、n は 0 又は正の整数を、k は正の整数を表す。但し、n が 2 以上の場合、2 以上存在する R_2 は同一

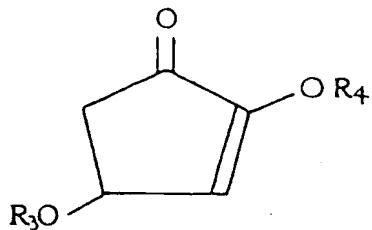
でも異なっていてもよく、XがO⁻の場合は内部塩となり、Y^{k-}は存在しない)



[IV]

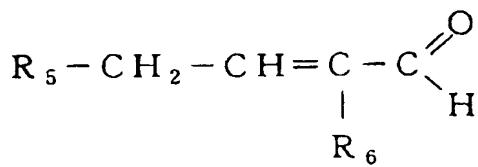


[V]



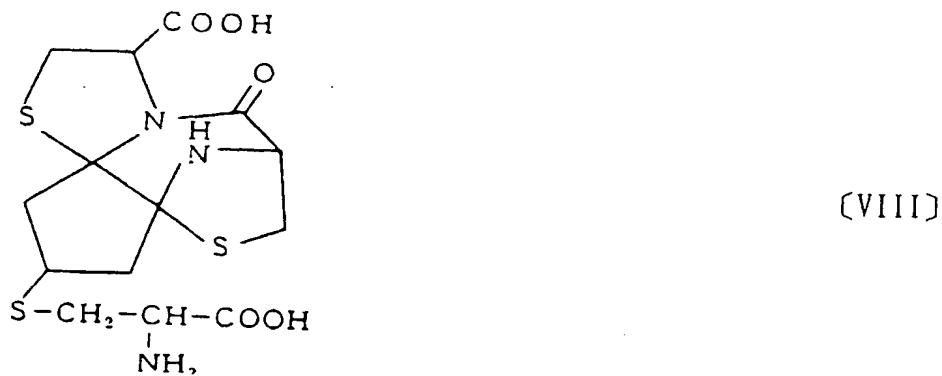
[VI]

(式 [VI] 中、R₃、R₄ は同一であっても異なってもよく、炭素数が1～3のアルキル基である。)



[VII]

(式 [VII] 中、R₅、R₆ は同一であっても異なってもよく、芳香族アミノ酸の芳香環である。)



2. 請求の範囲 1 記載のアポトーシス誘発用物質若しくはその光学活性体、又はそれらの塩を含有することを特徴とする医薬用組成物。
3. 医薬用組成物が、制がん剤である請求の範囲 2 記載の医薬用組成物。

図 1

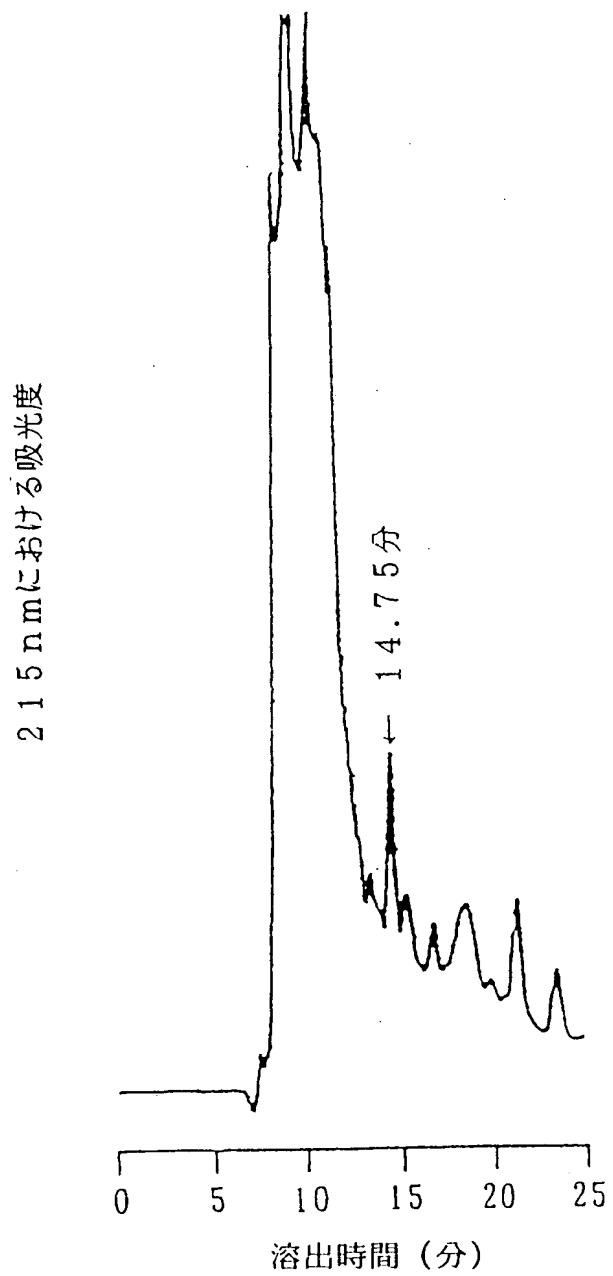
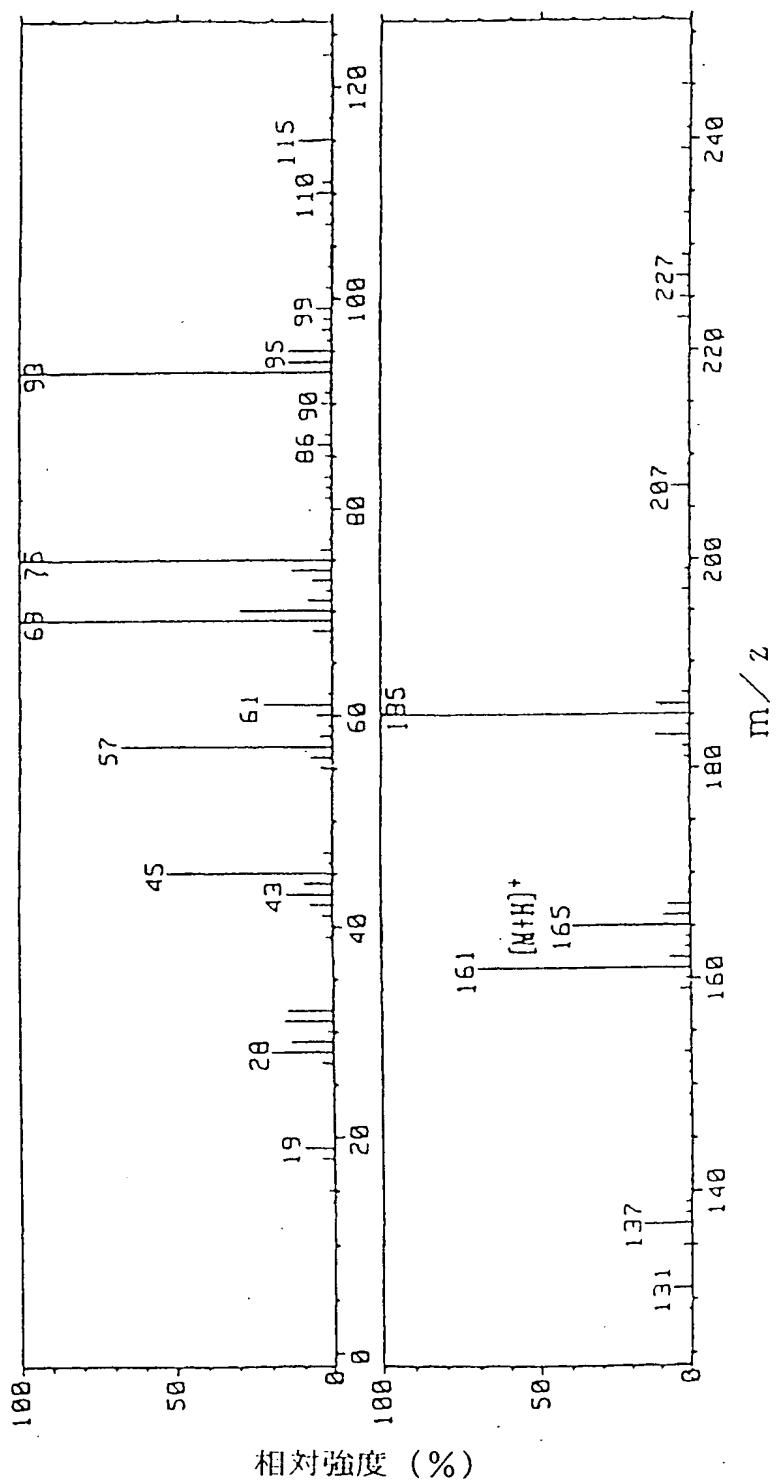
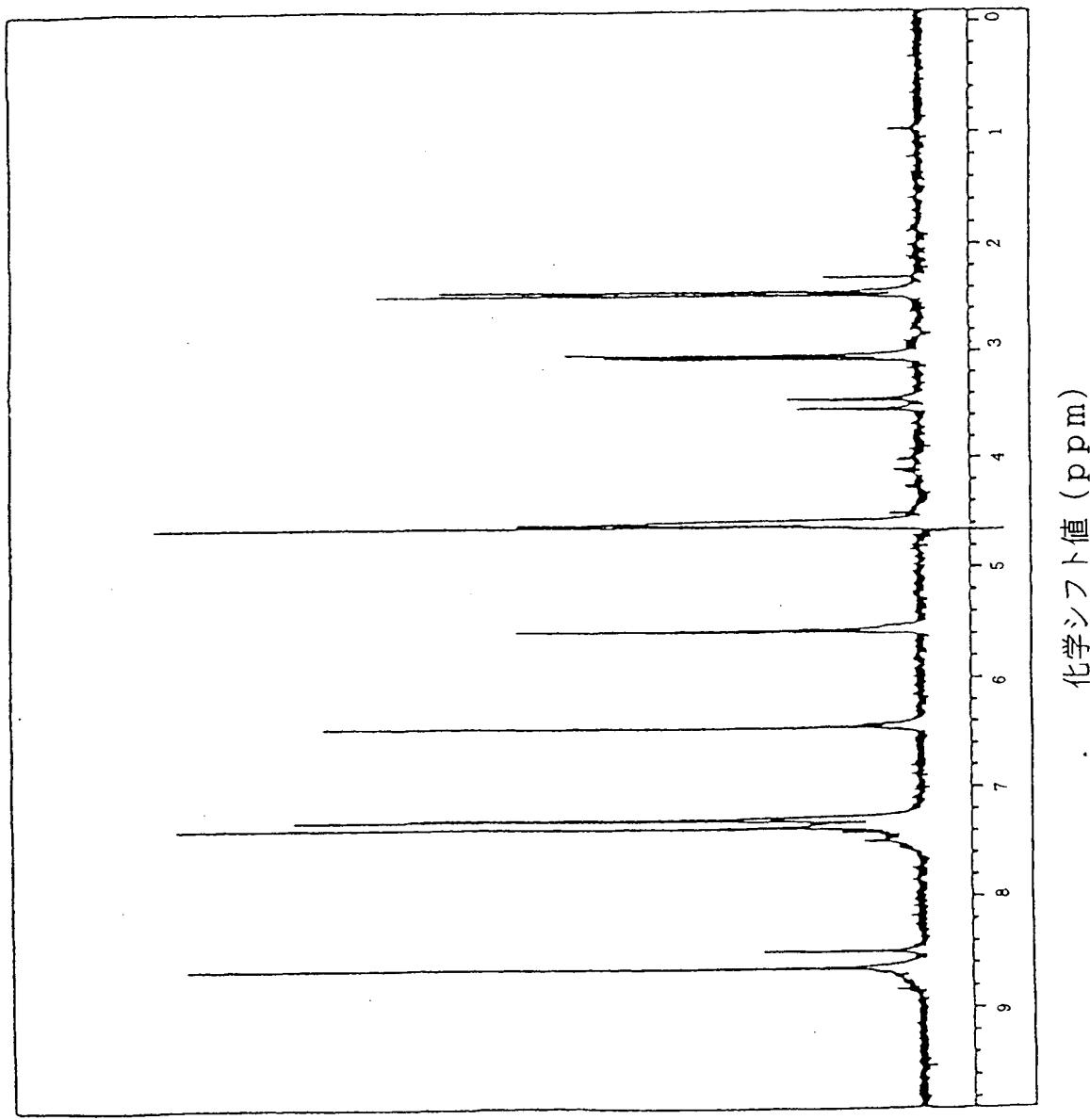


図 2



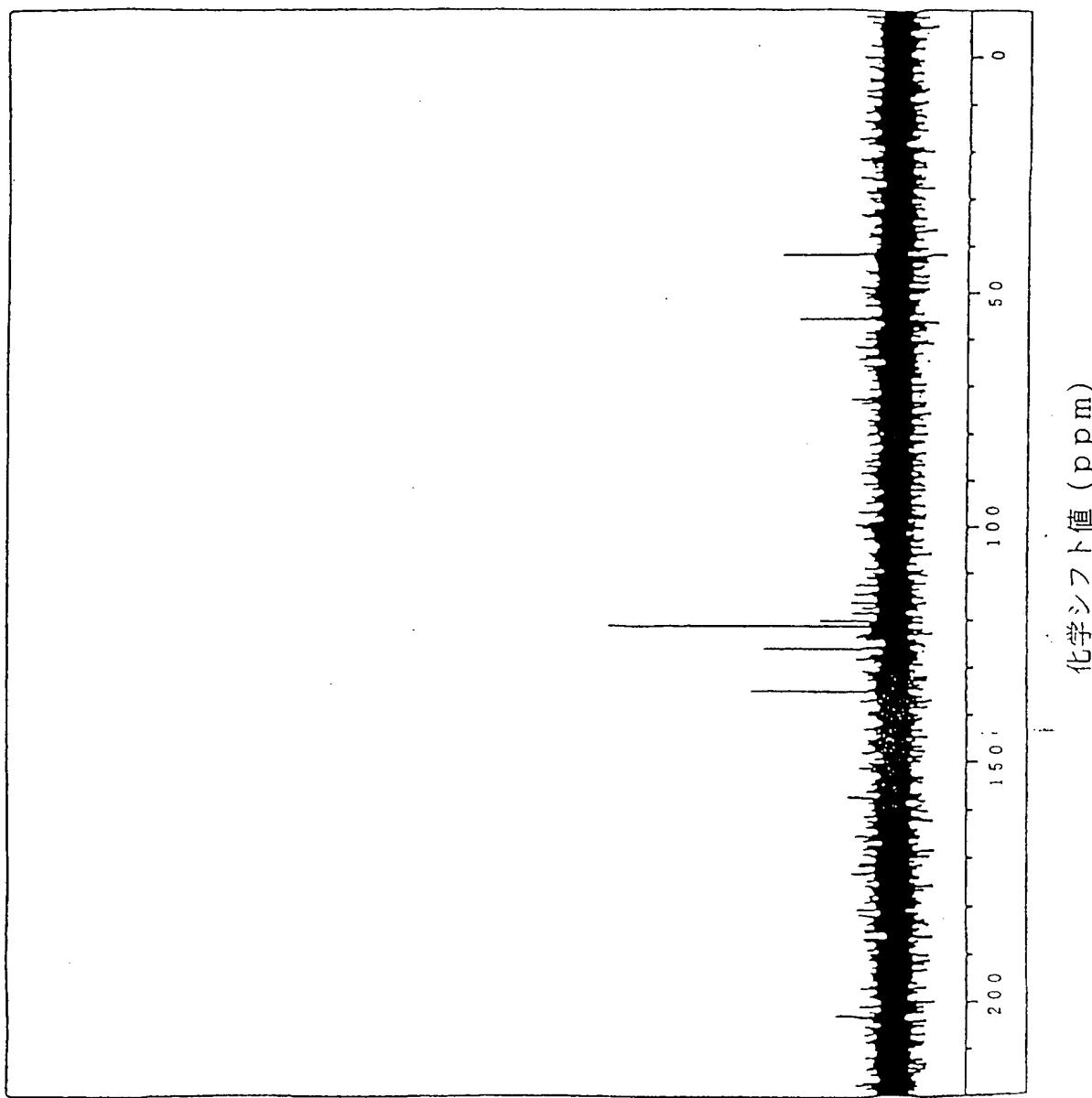
相対強度 (%)

図 3



シグナルの強度

図 4



シグナルの強度

図 5

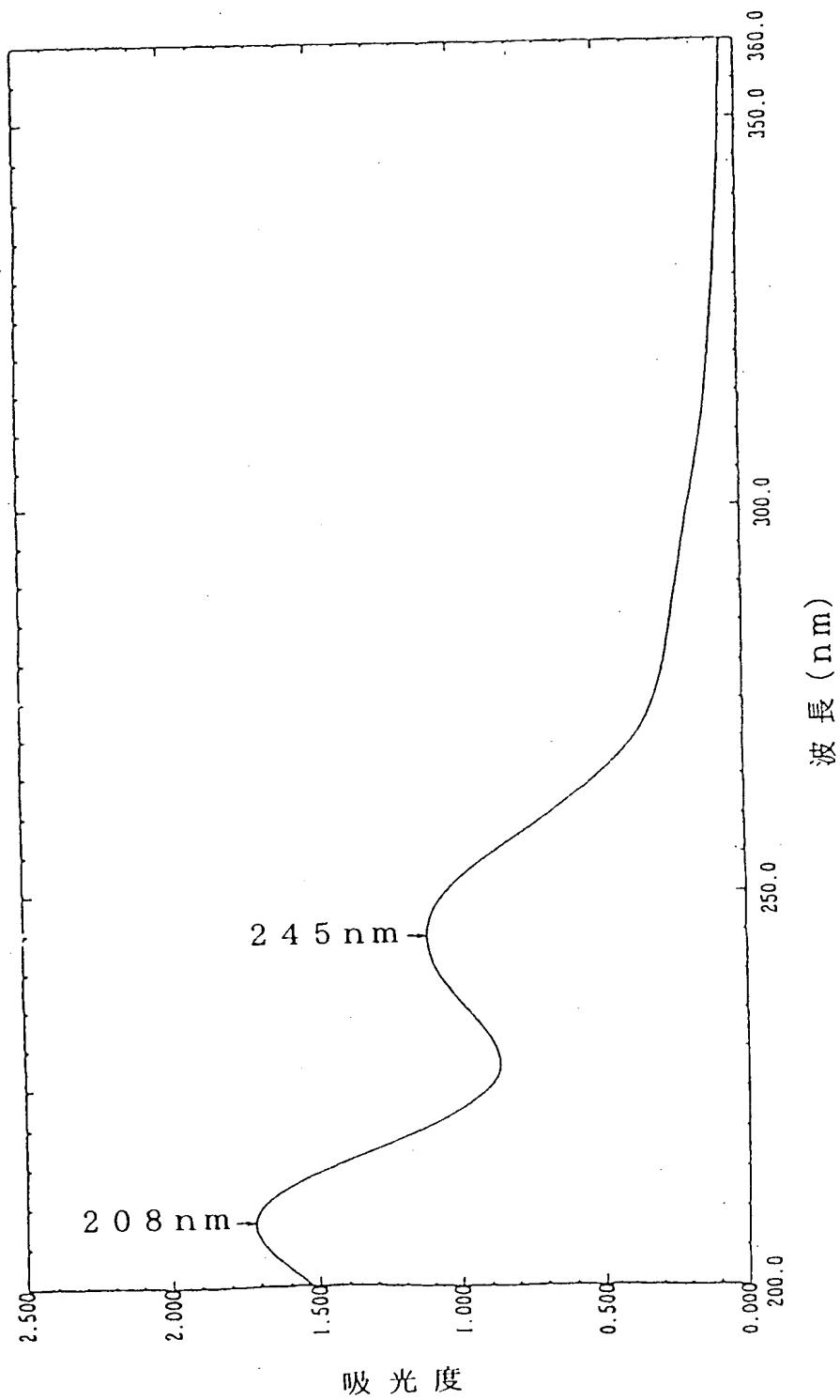


図 6

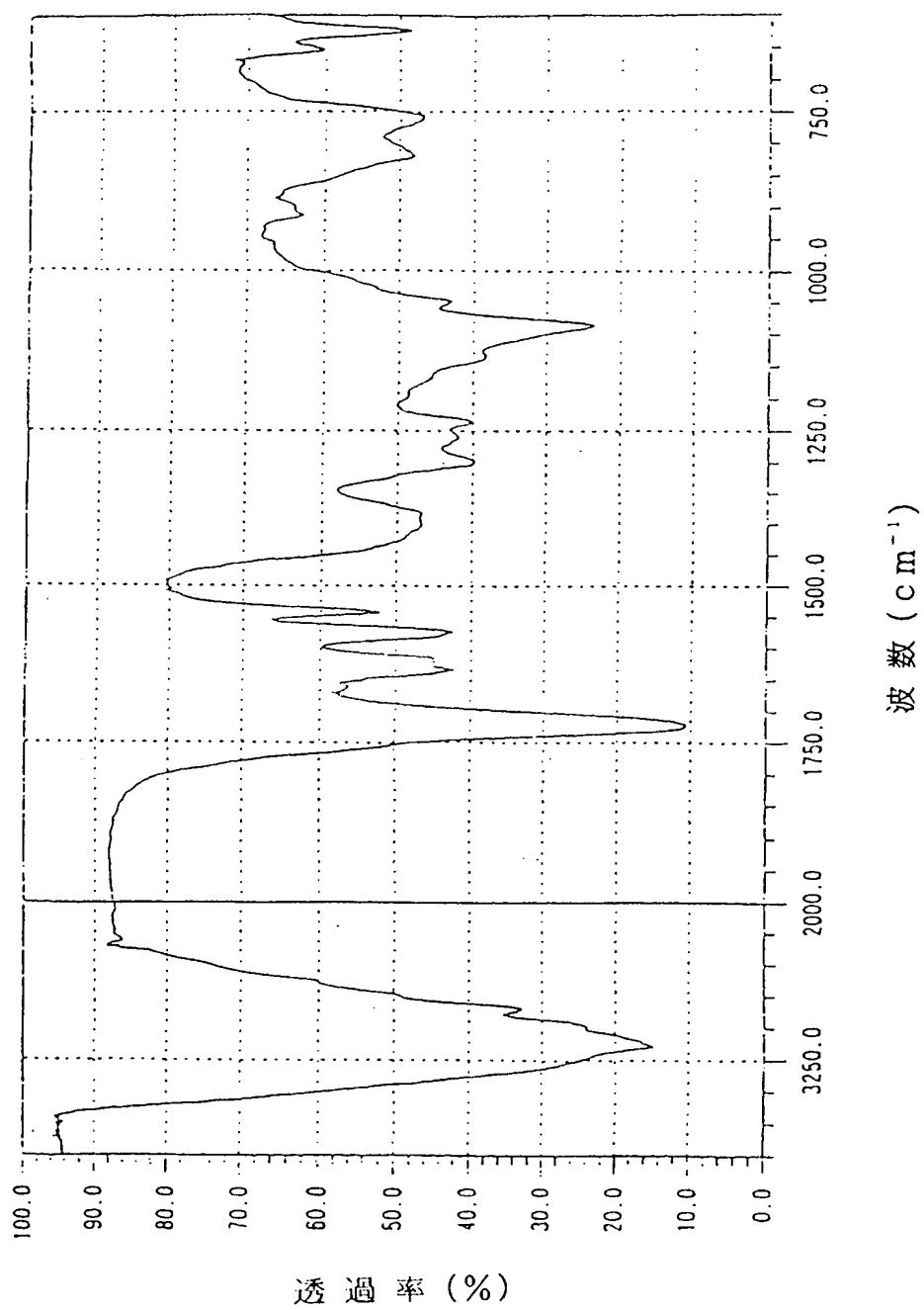


図 7

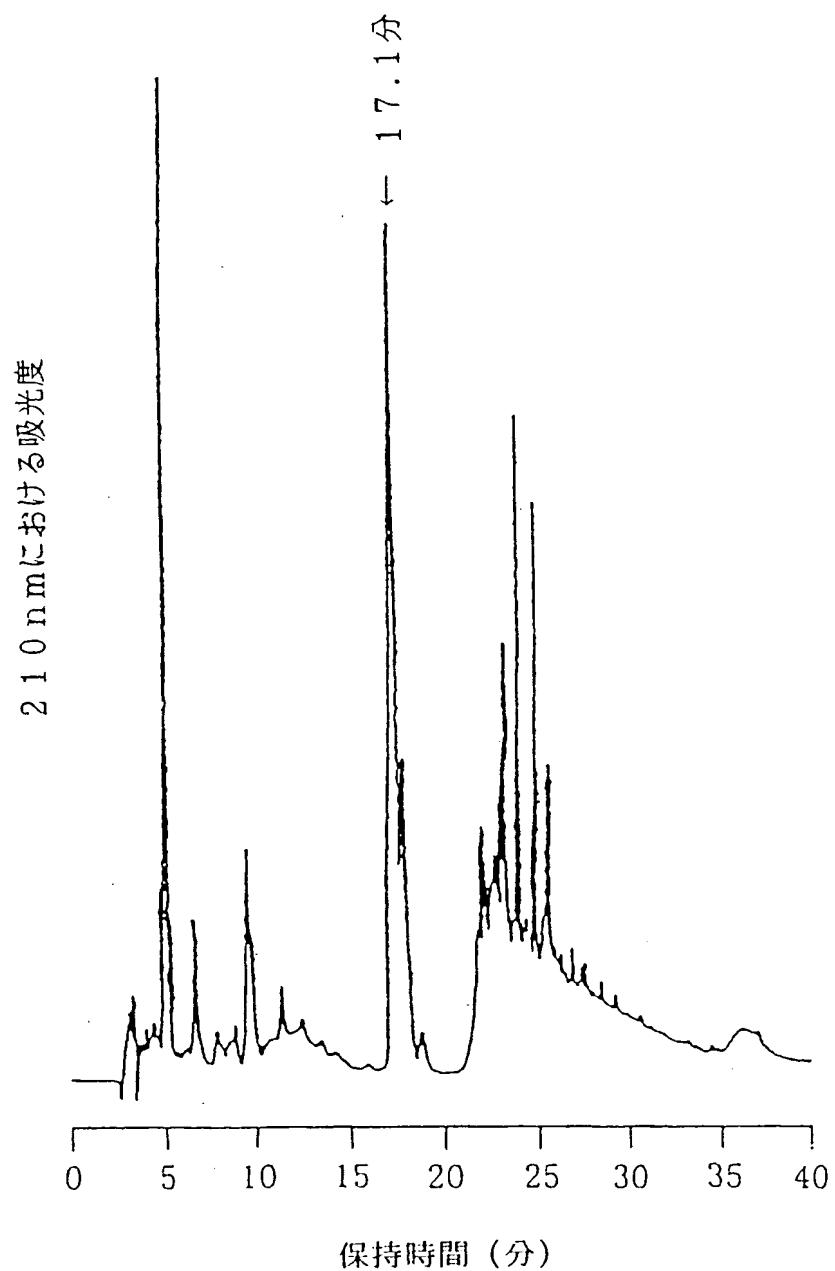


図 8

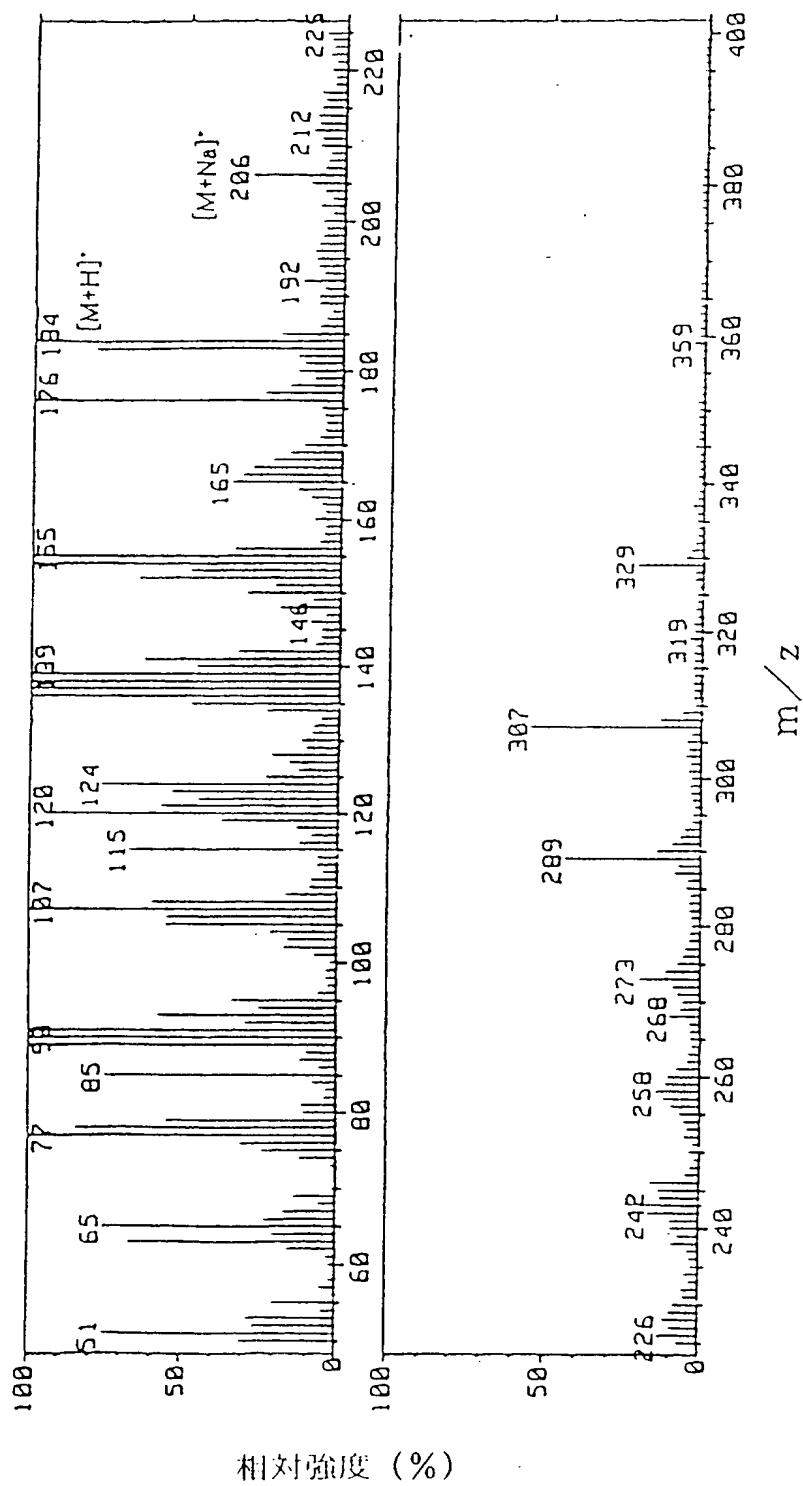
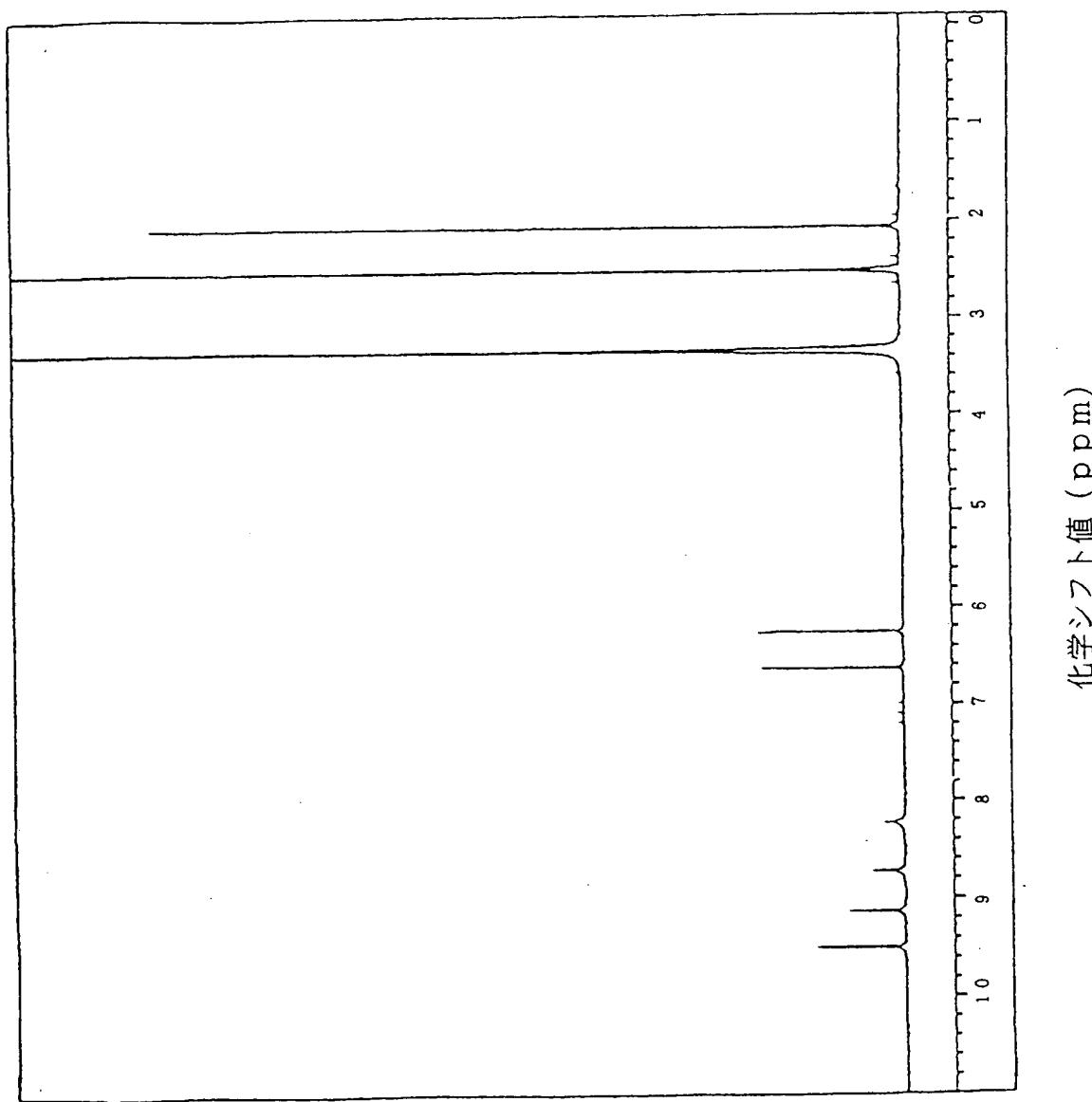
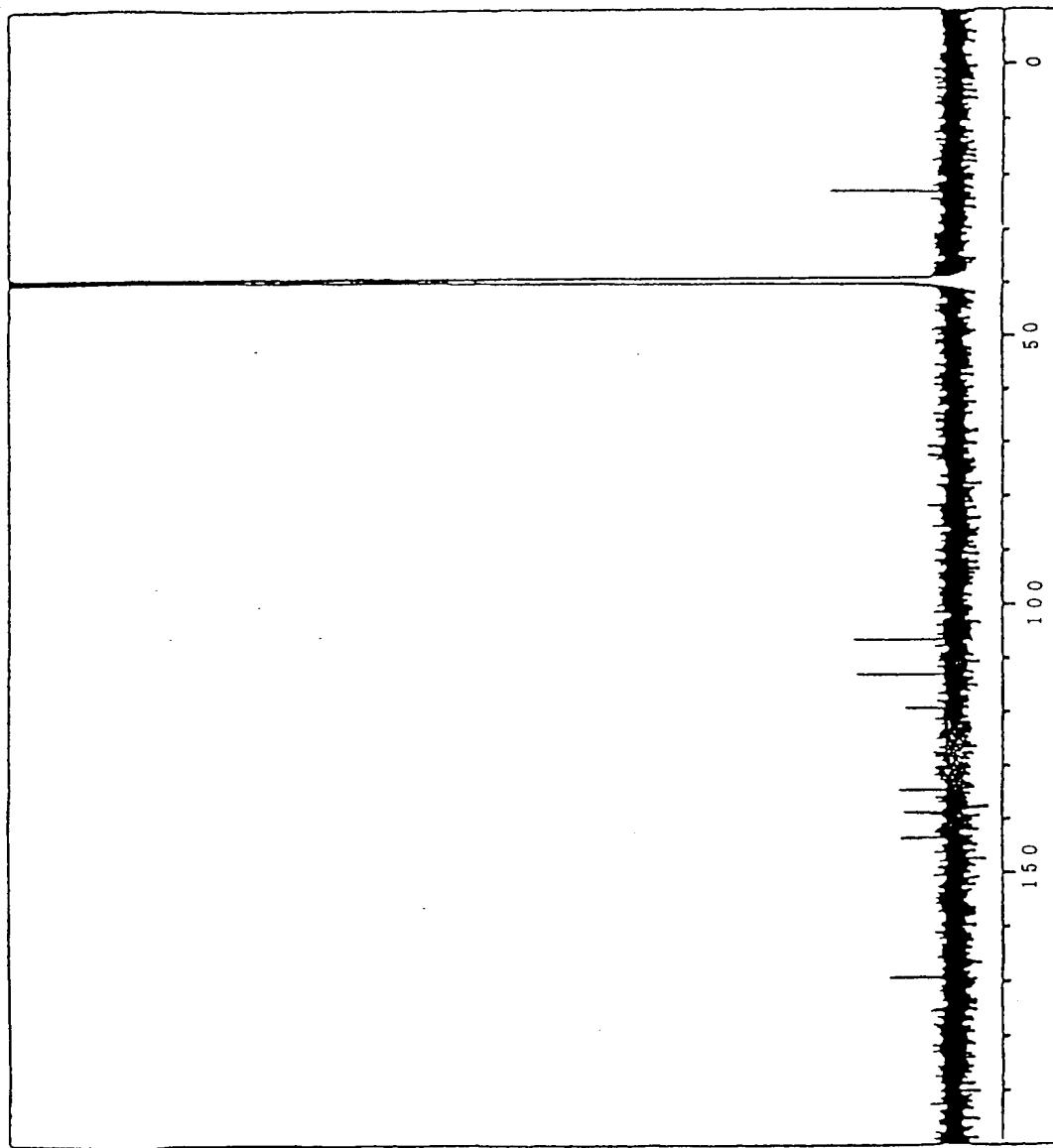


図 9



シグナルの強度

図 10



化學シフト値 (ppm)

シグナルの強度

図 1 1

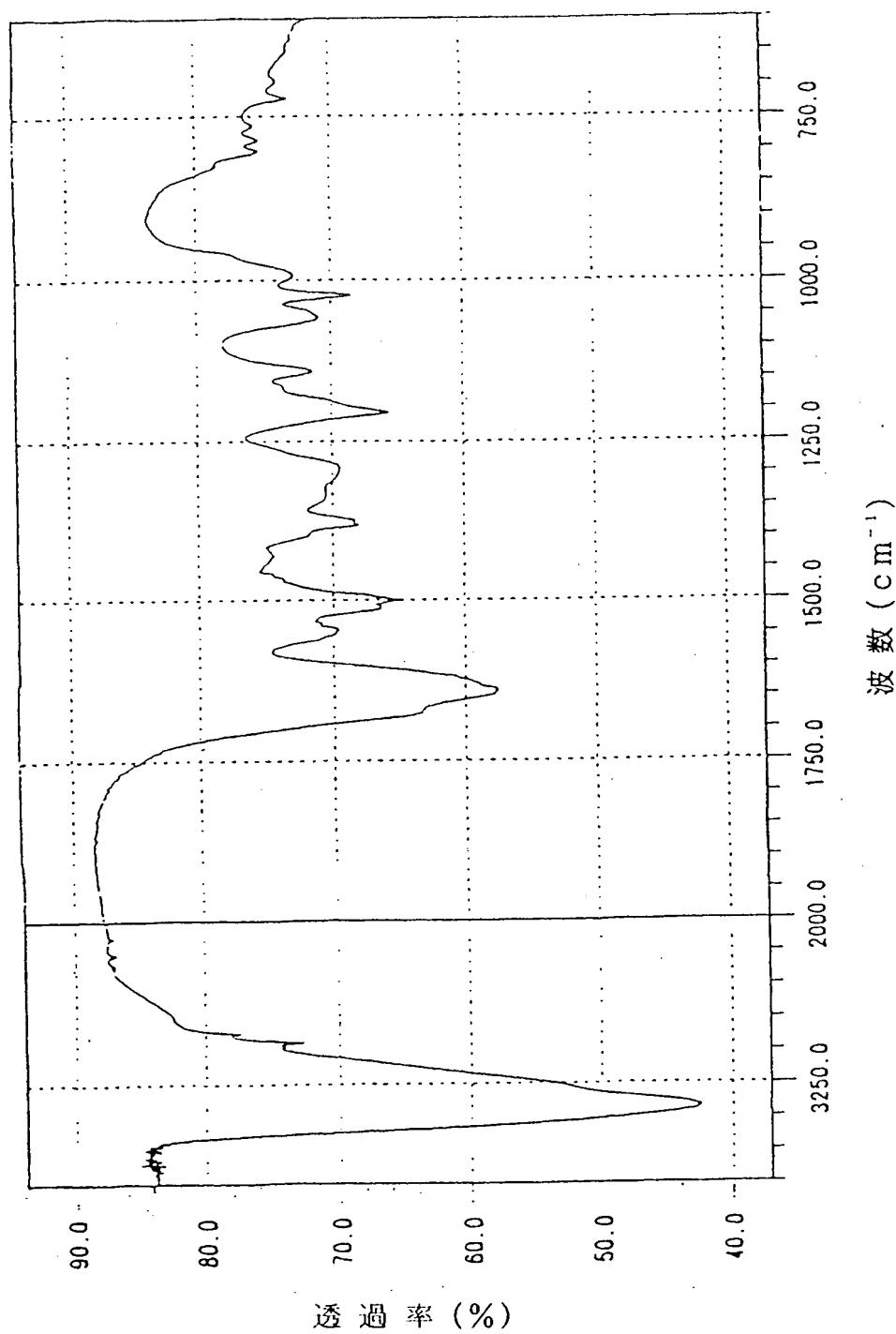


図 1 2

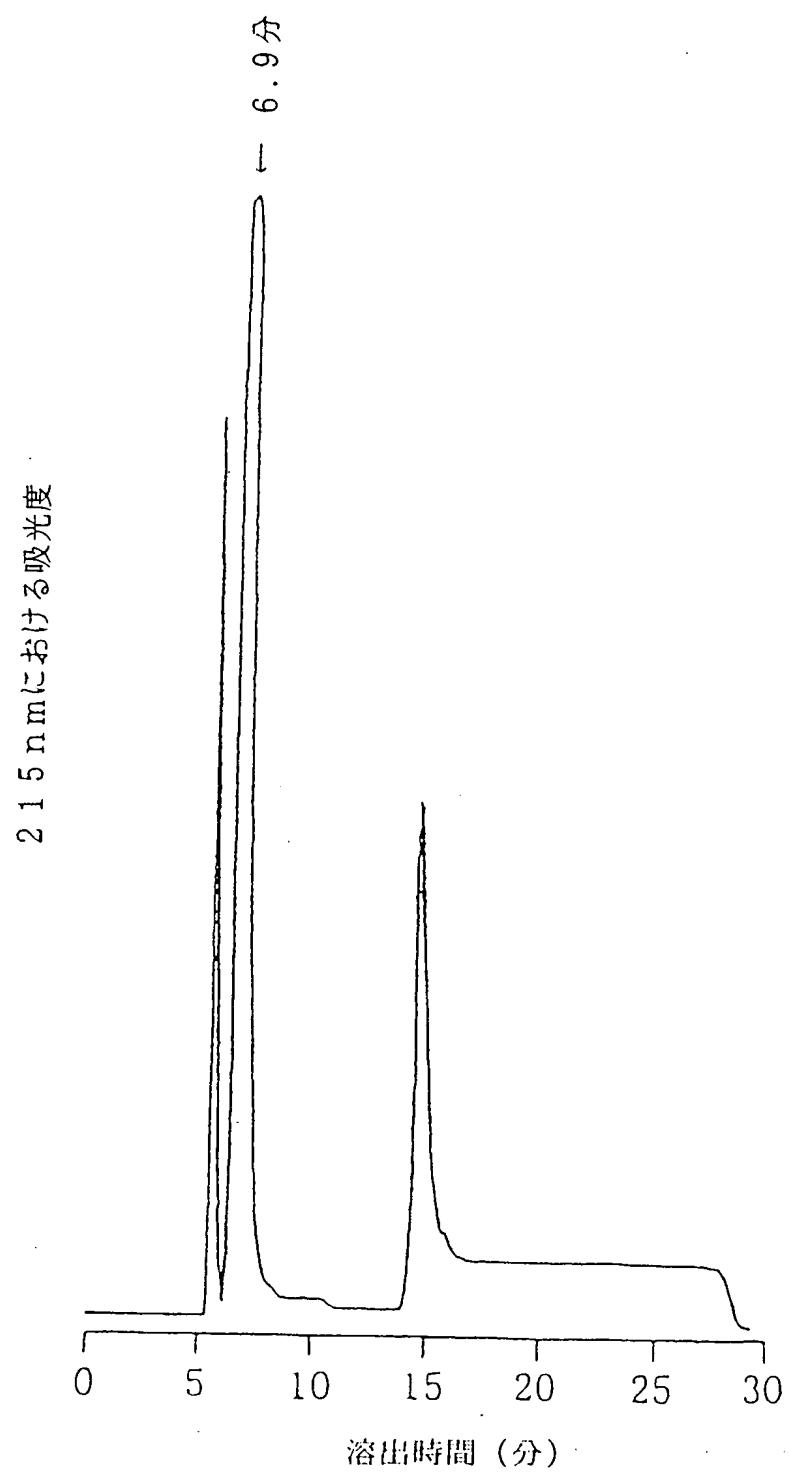


図 13

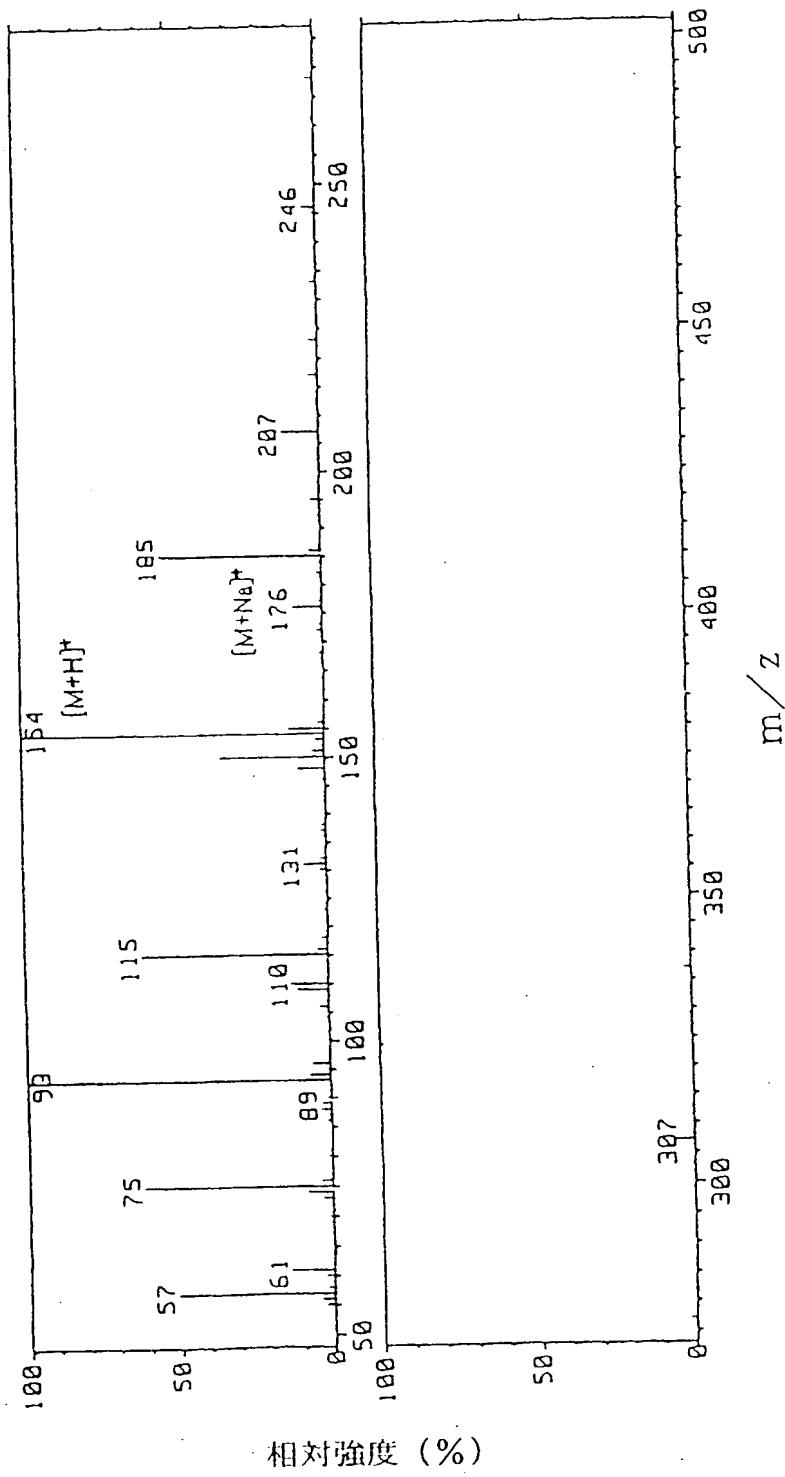
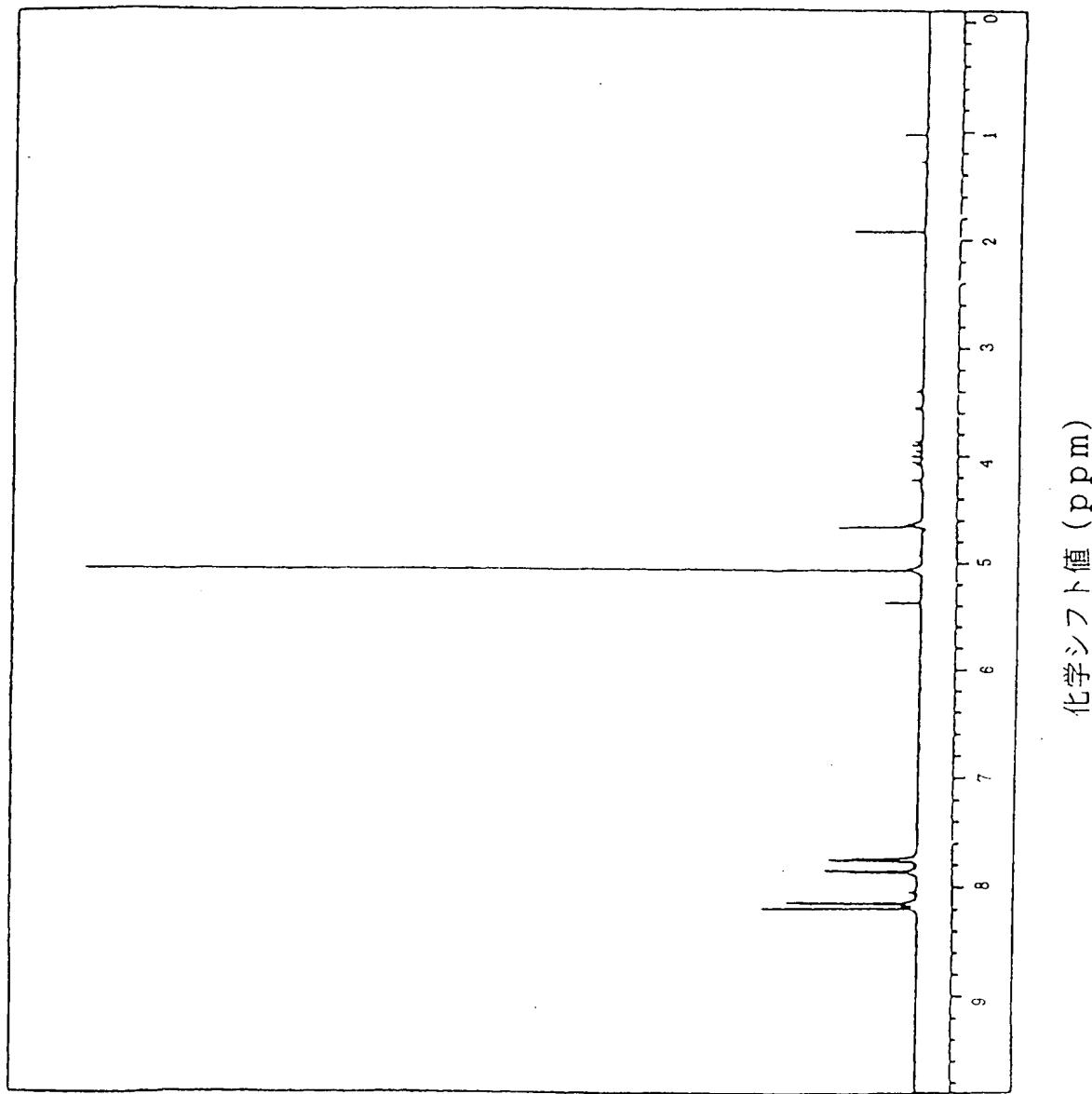
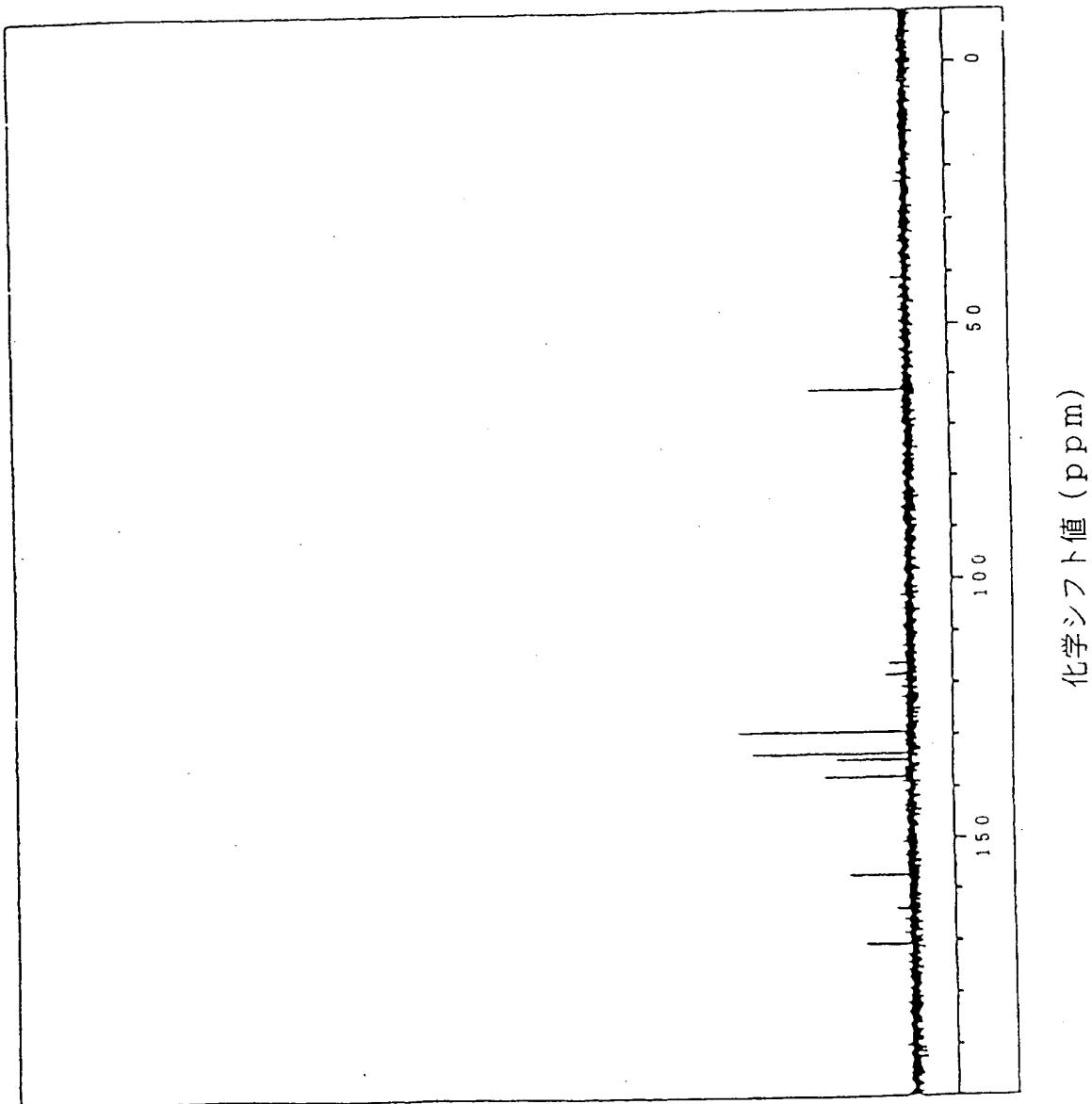


図 1 4



シグナルの強度

図 15



シグナルの強度

図 1 6

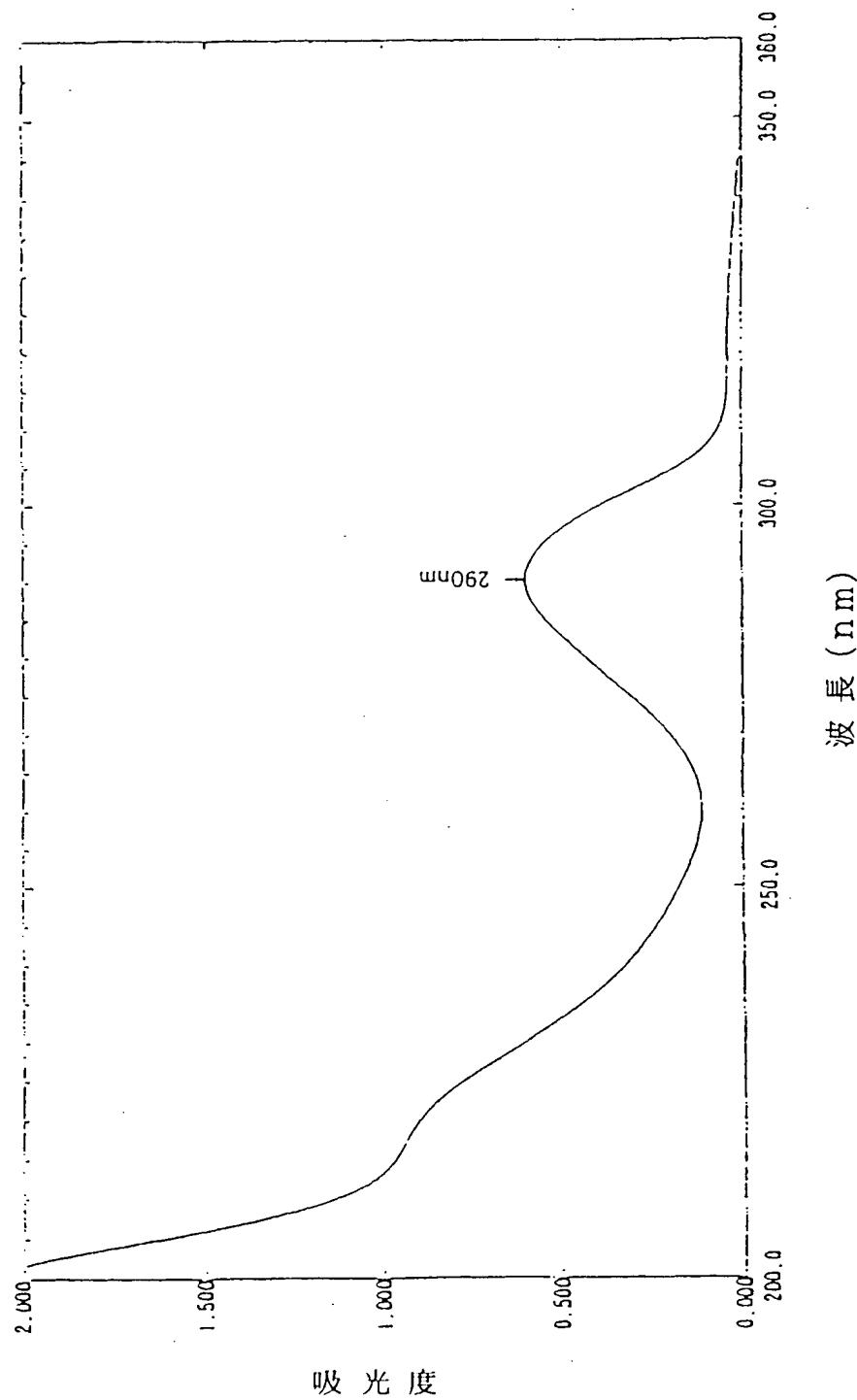


図 17

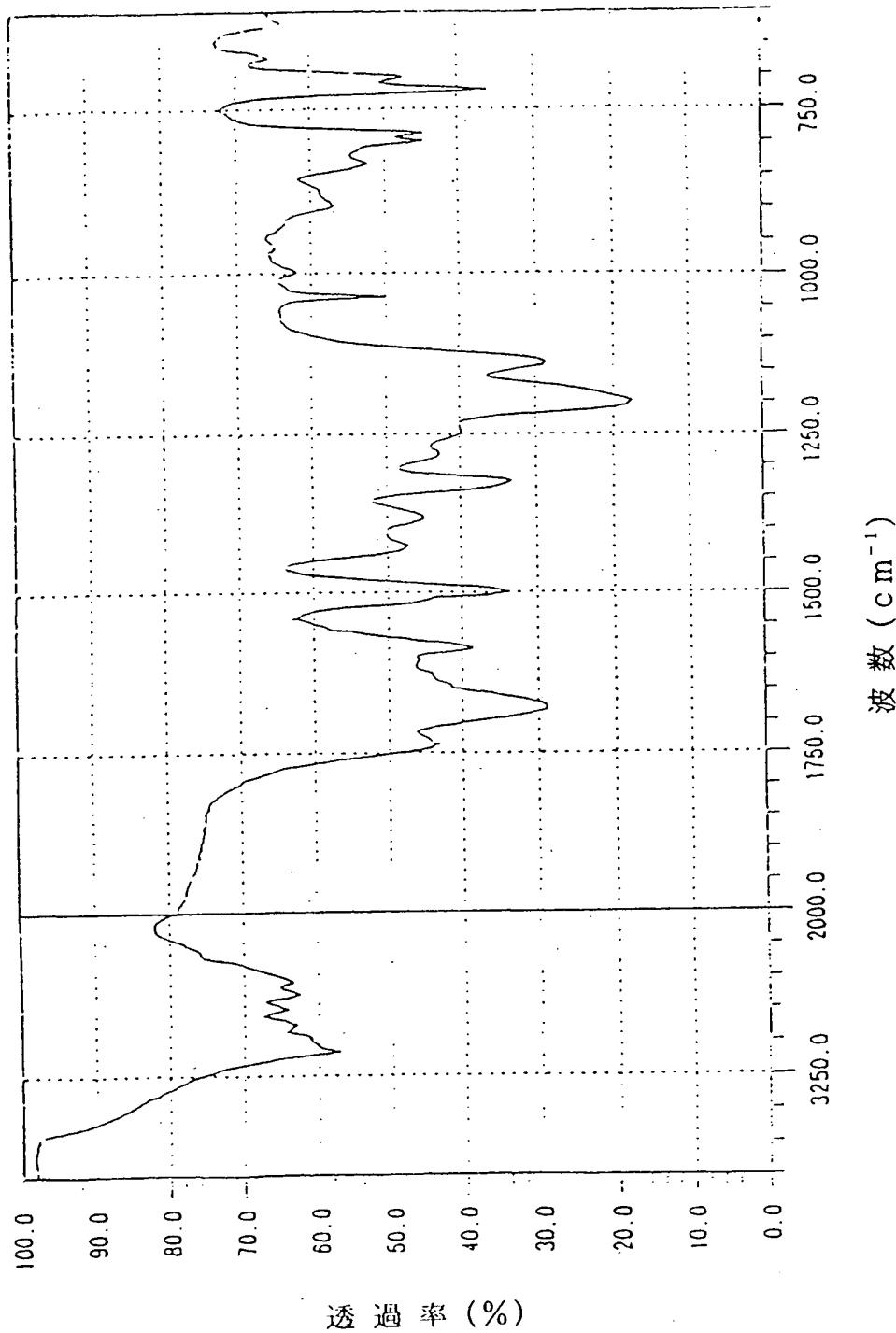
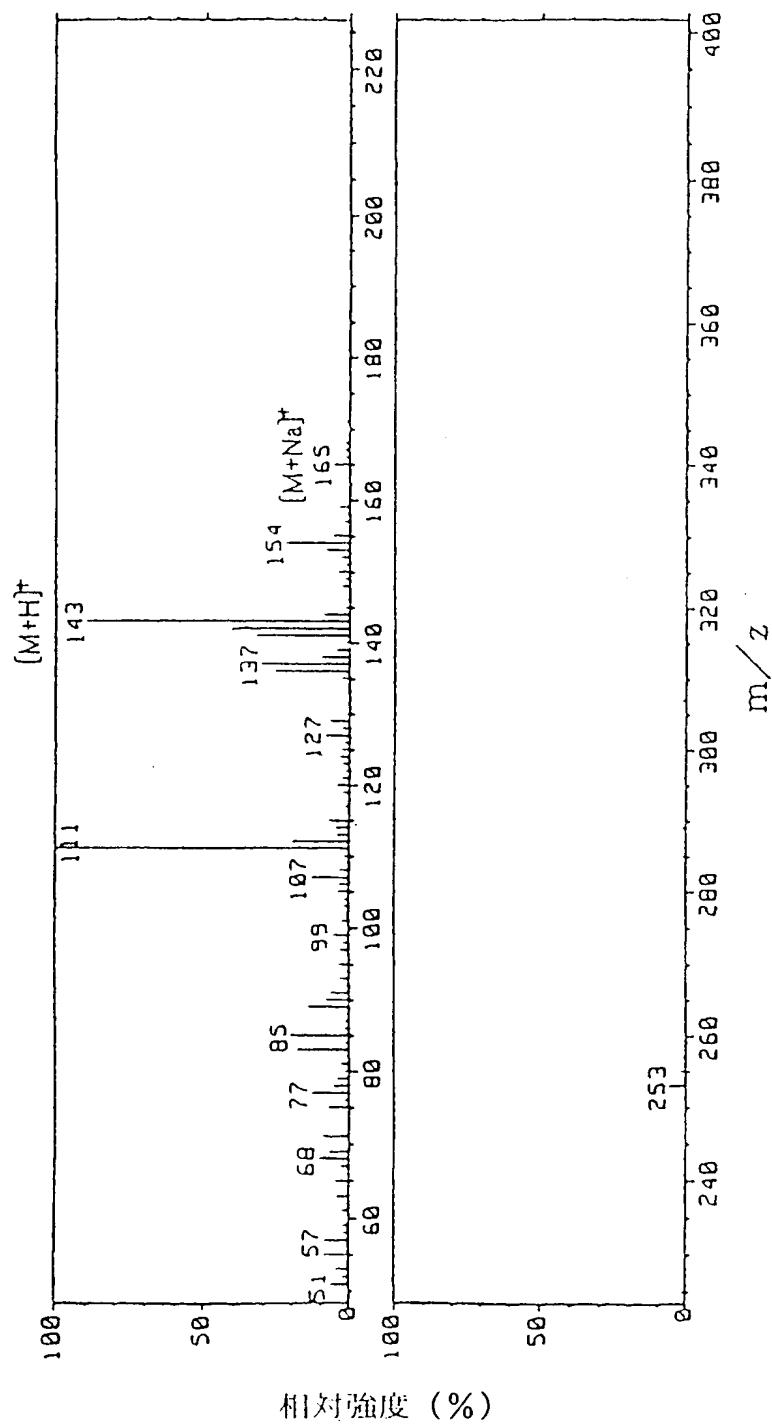
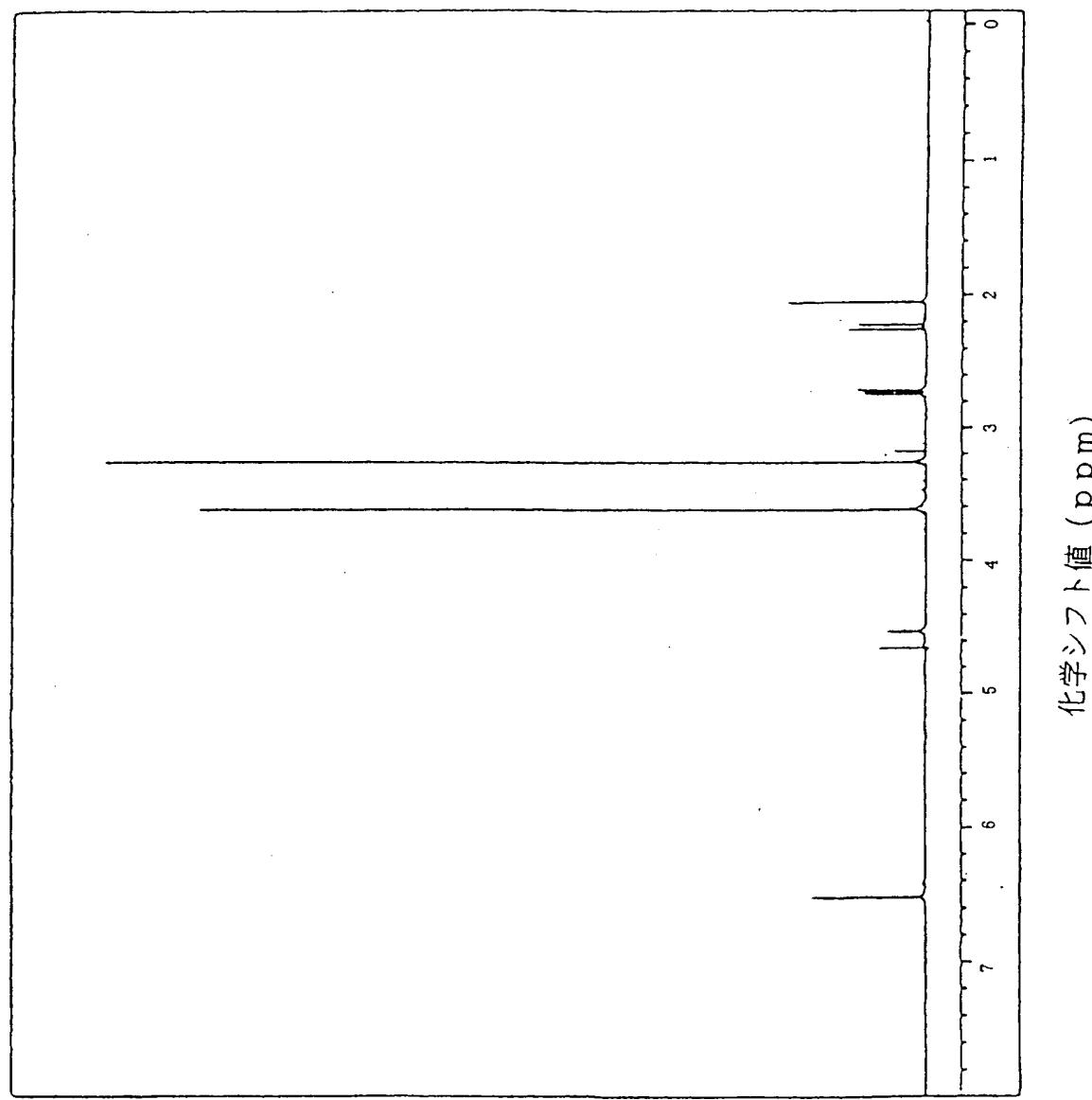


図 18



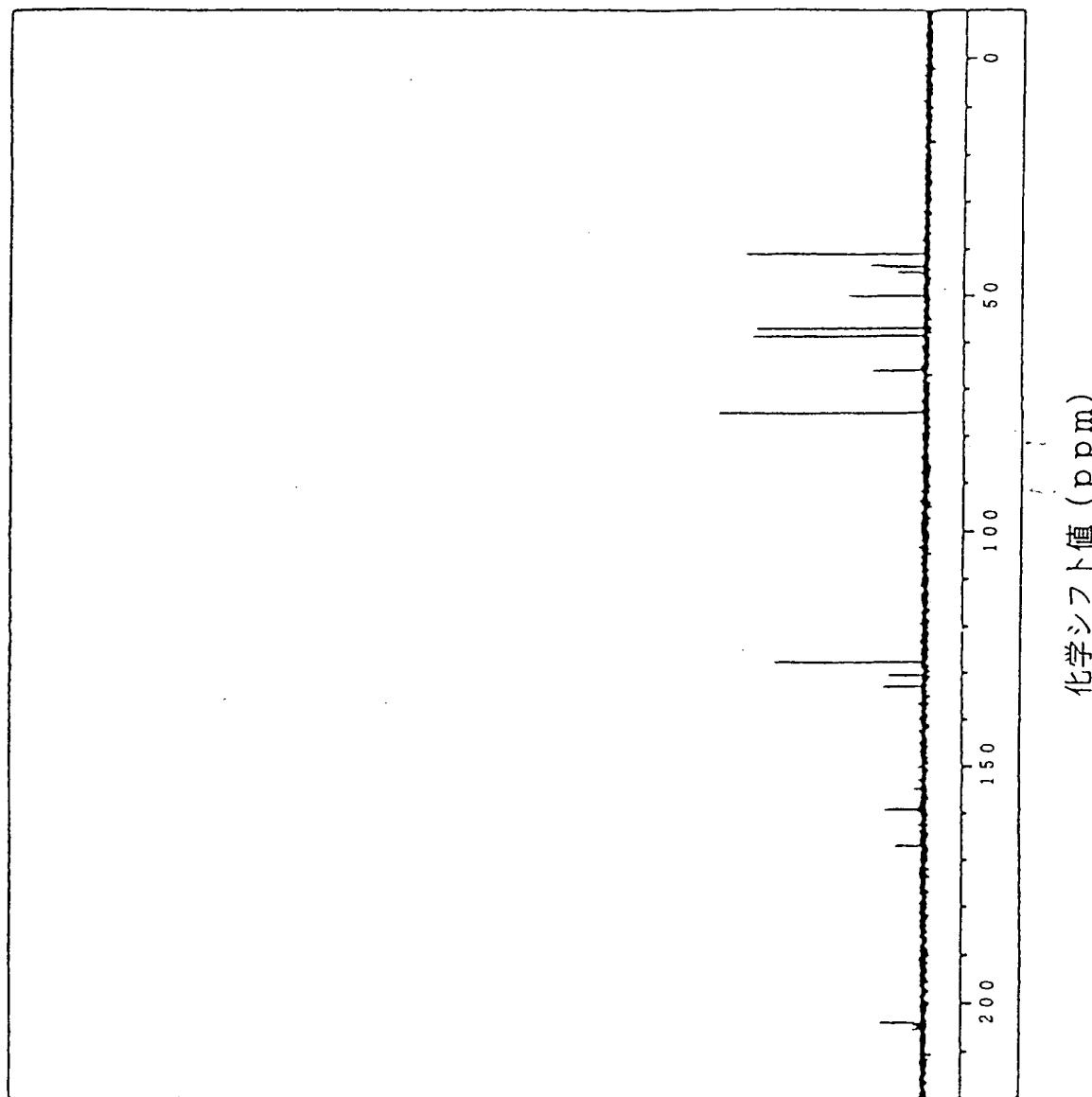
相対強度 (%)

図 1 9



シグナルの強度

図 20



シグナルの強度

図 2 1

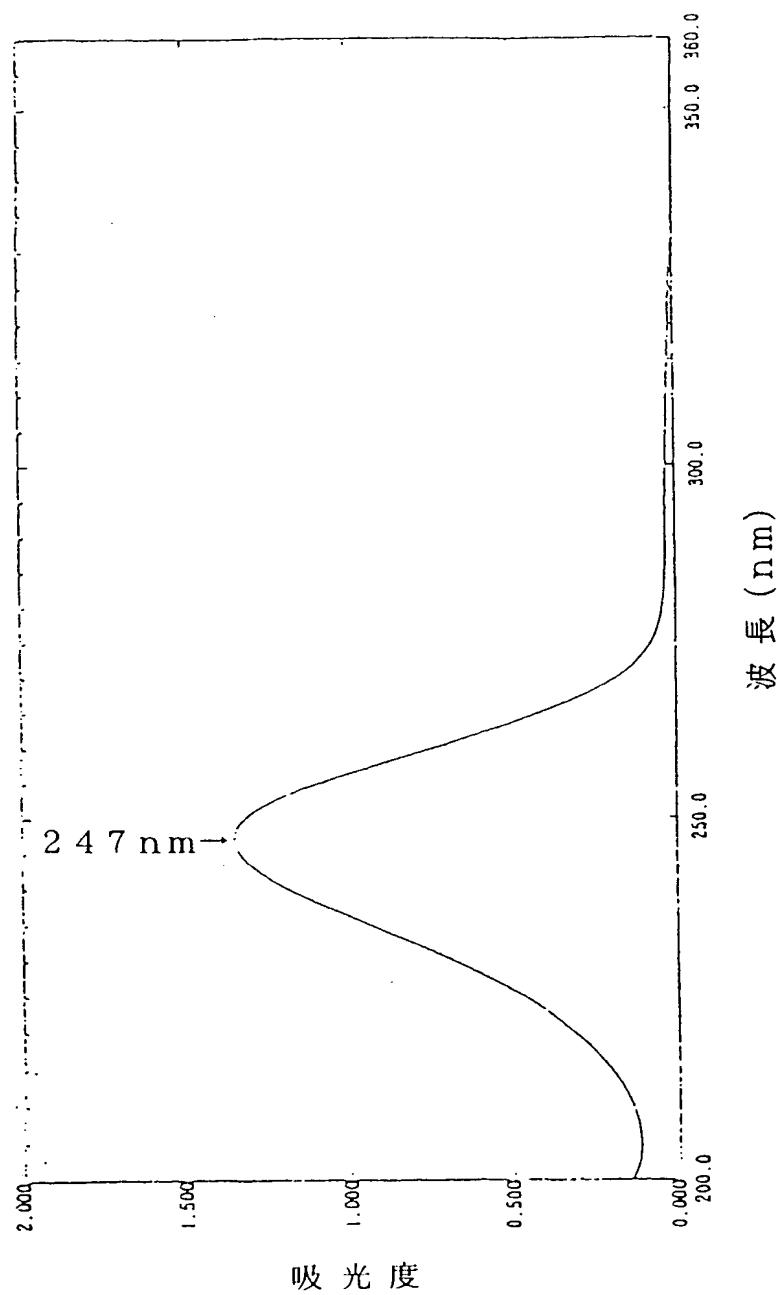


図 2 2

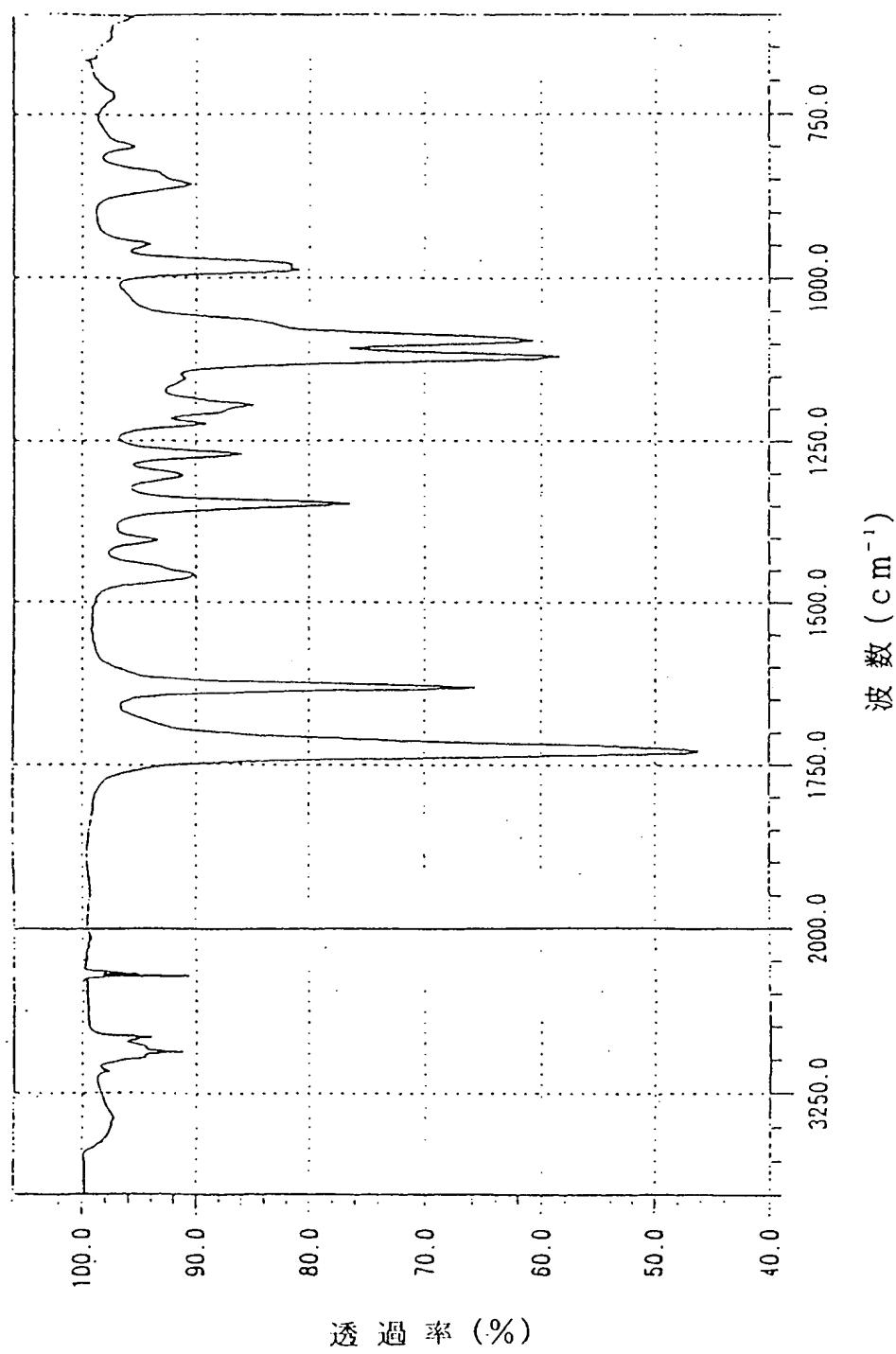
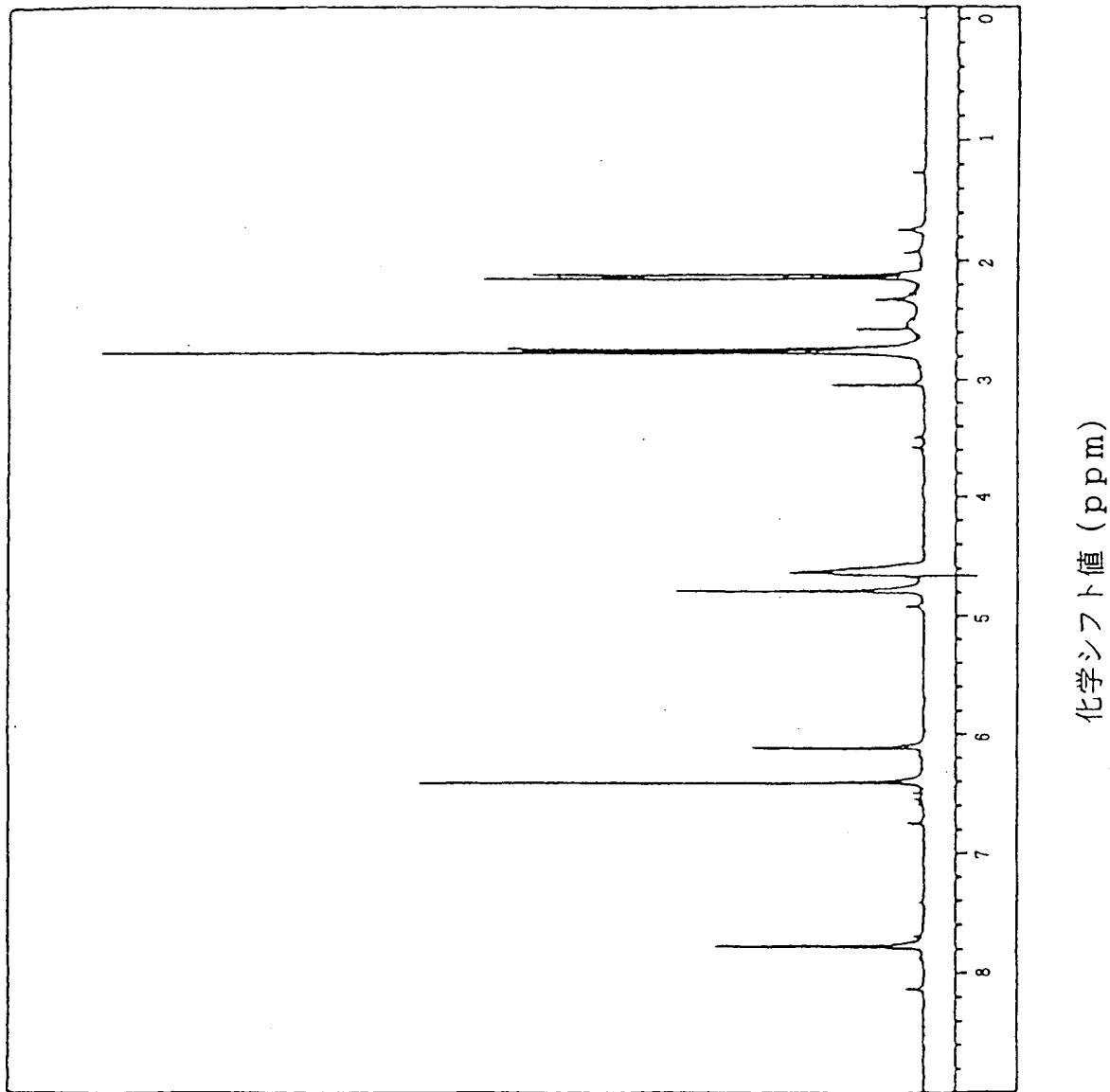
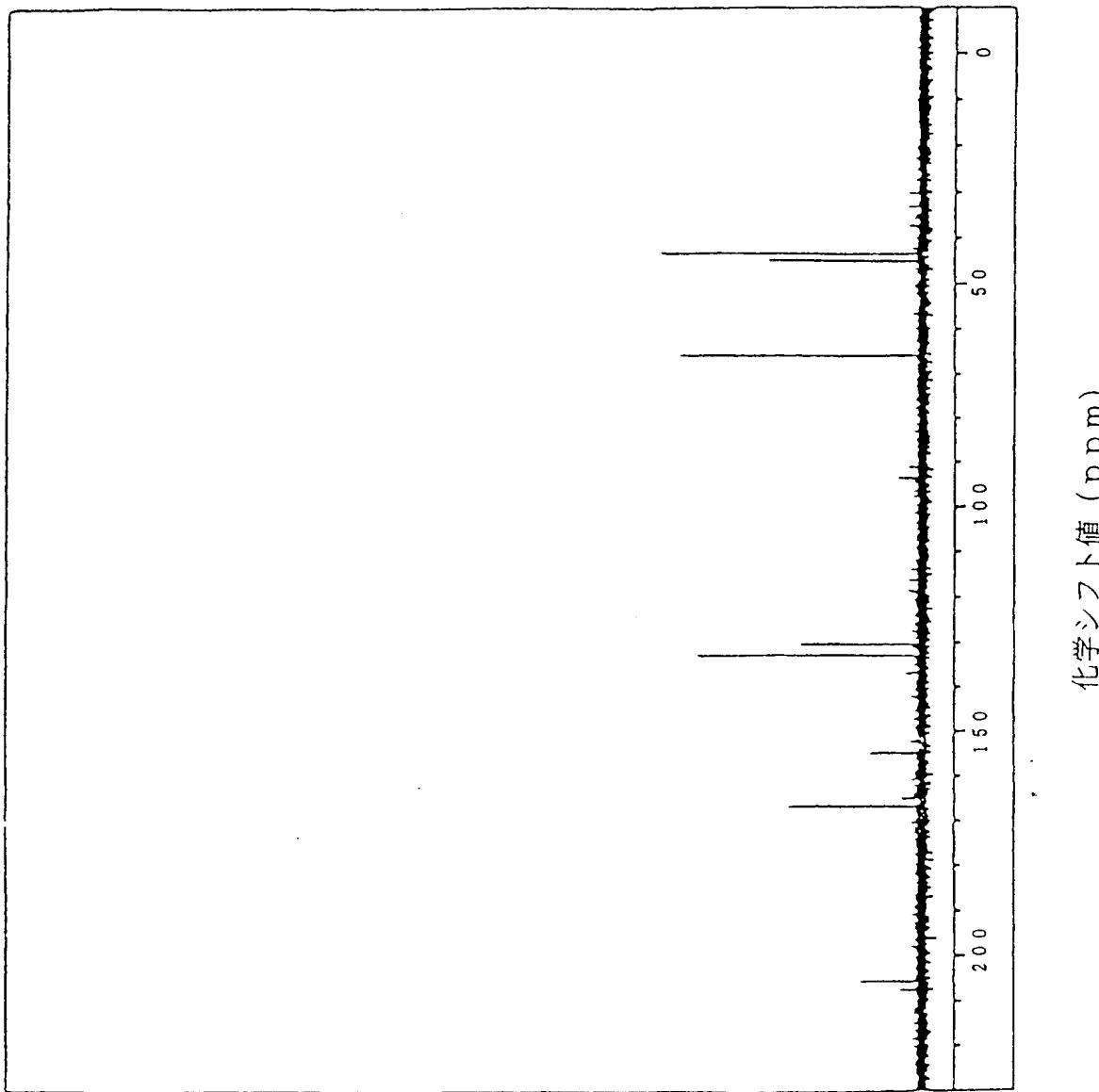


図 2 3



シグナルの強度

図 2 4



シグナルの強度

図 25

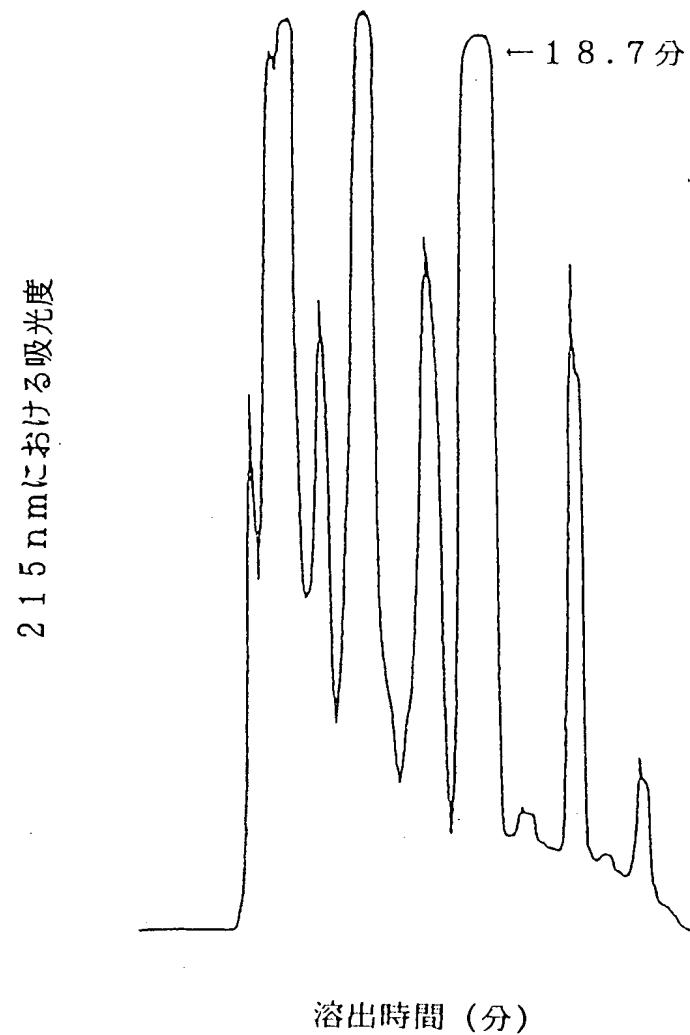
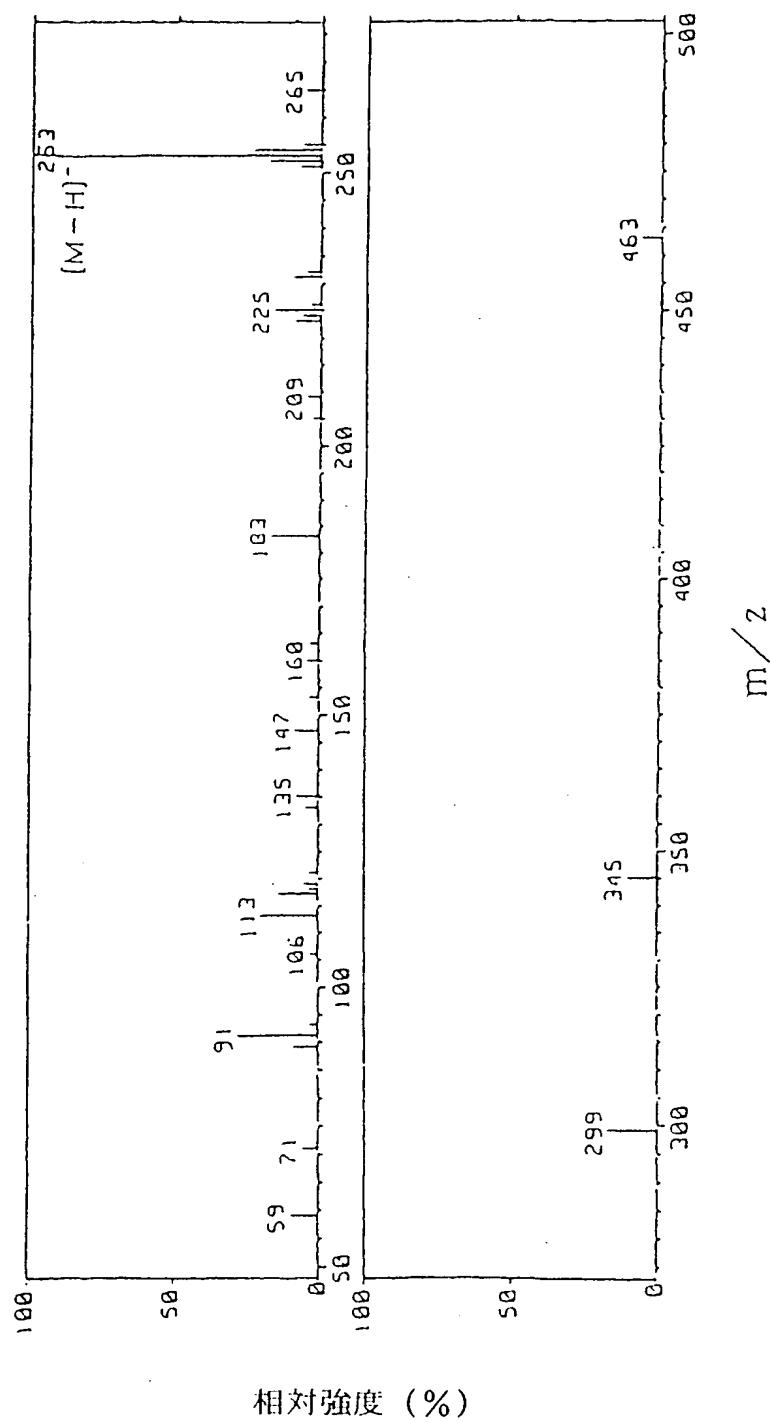
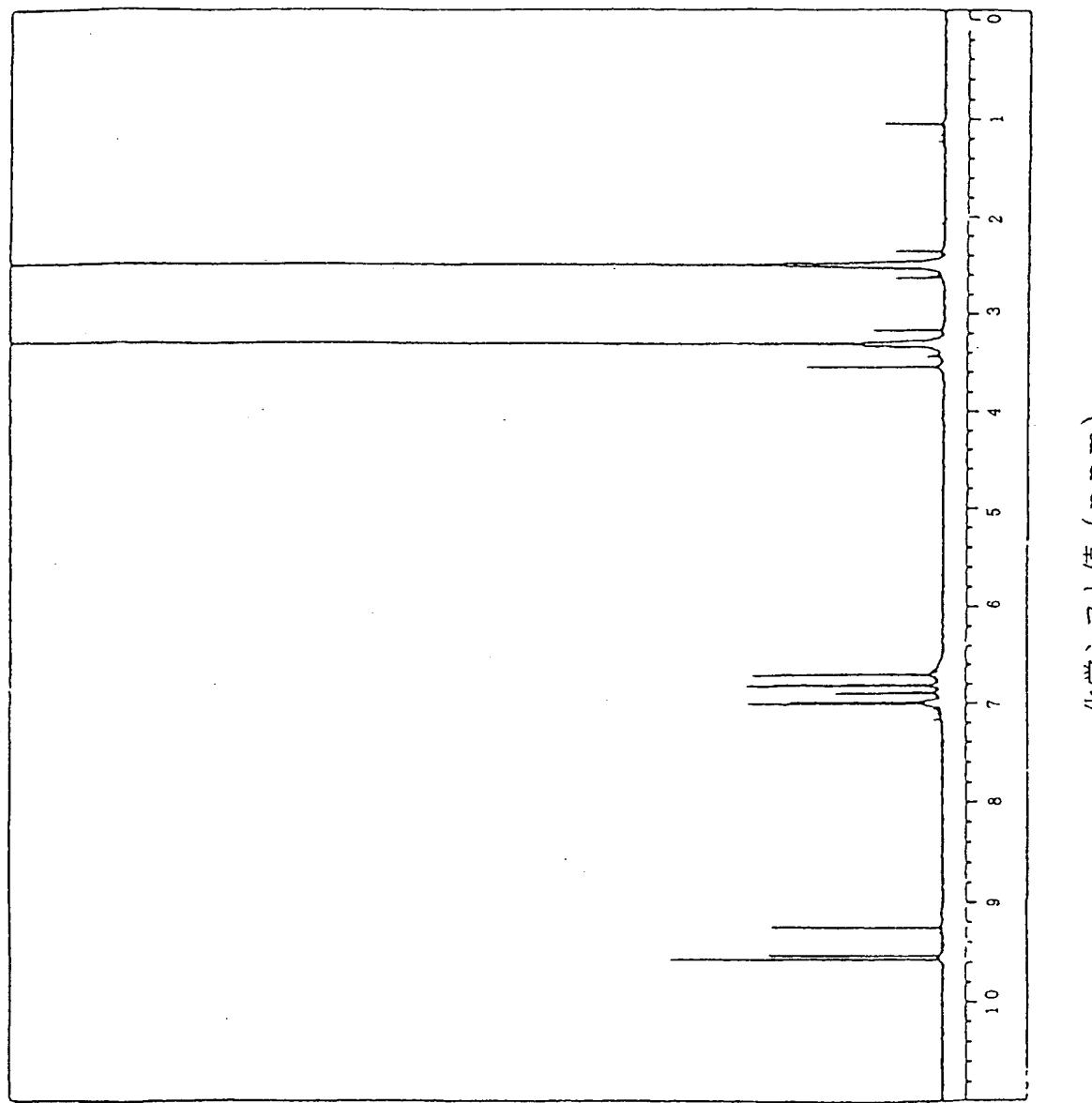


図 2 6



相对強度 (%)

図 2 7



シグナルの強度

図 2 8

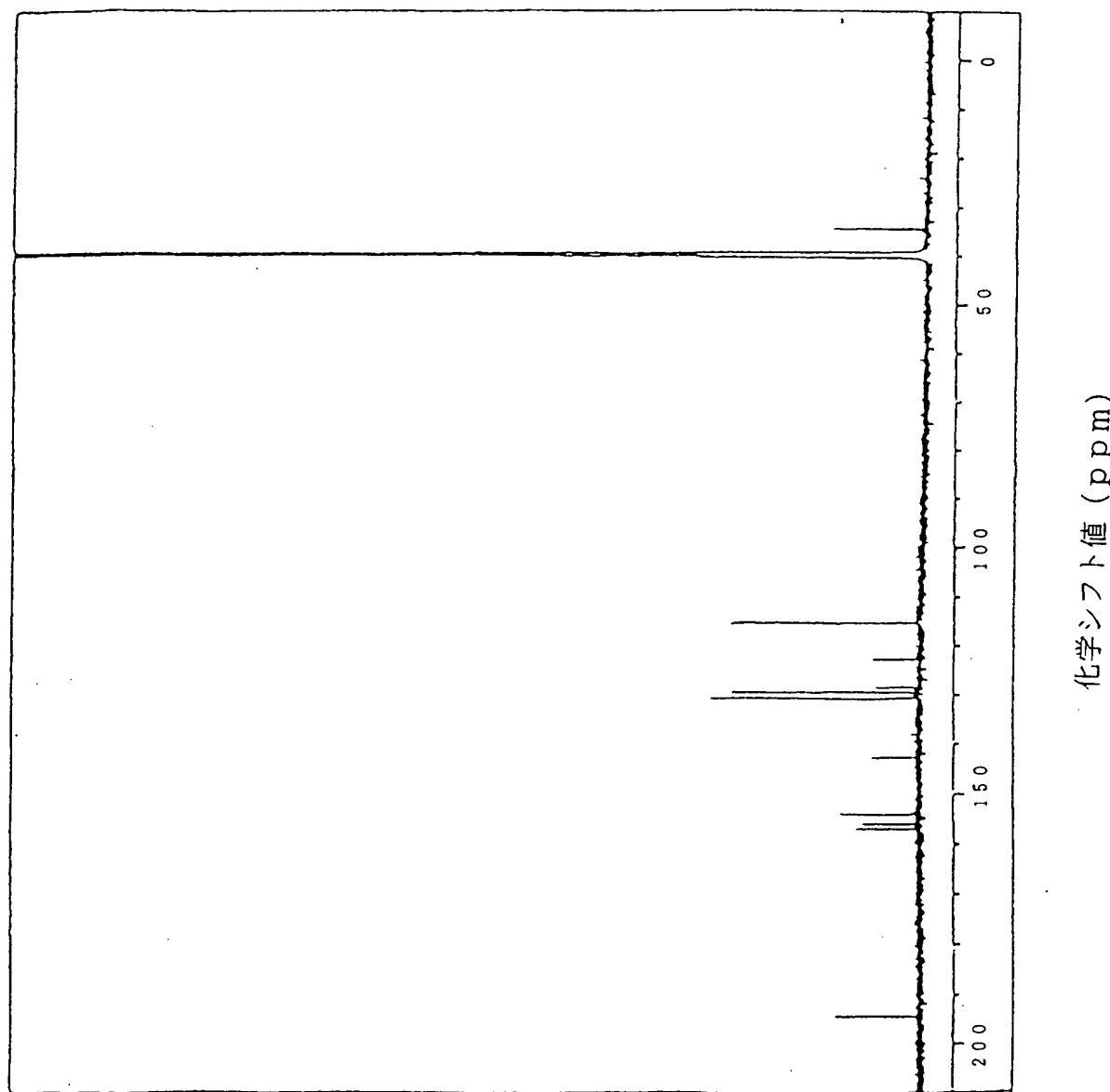


図 2 9

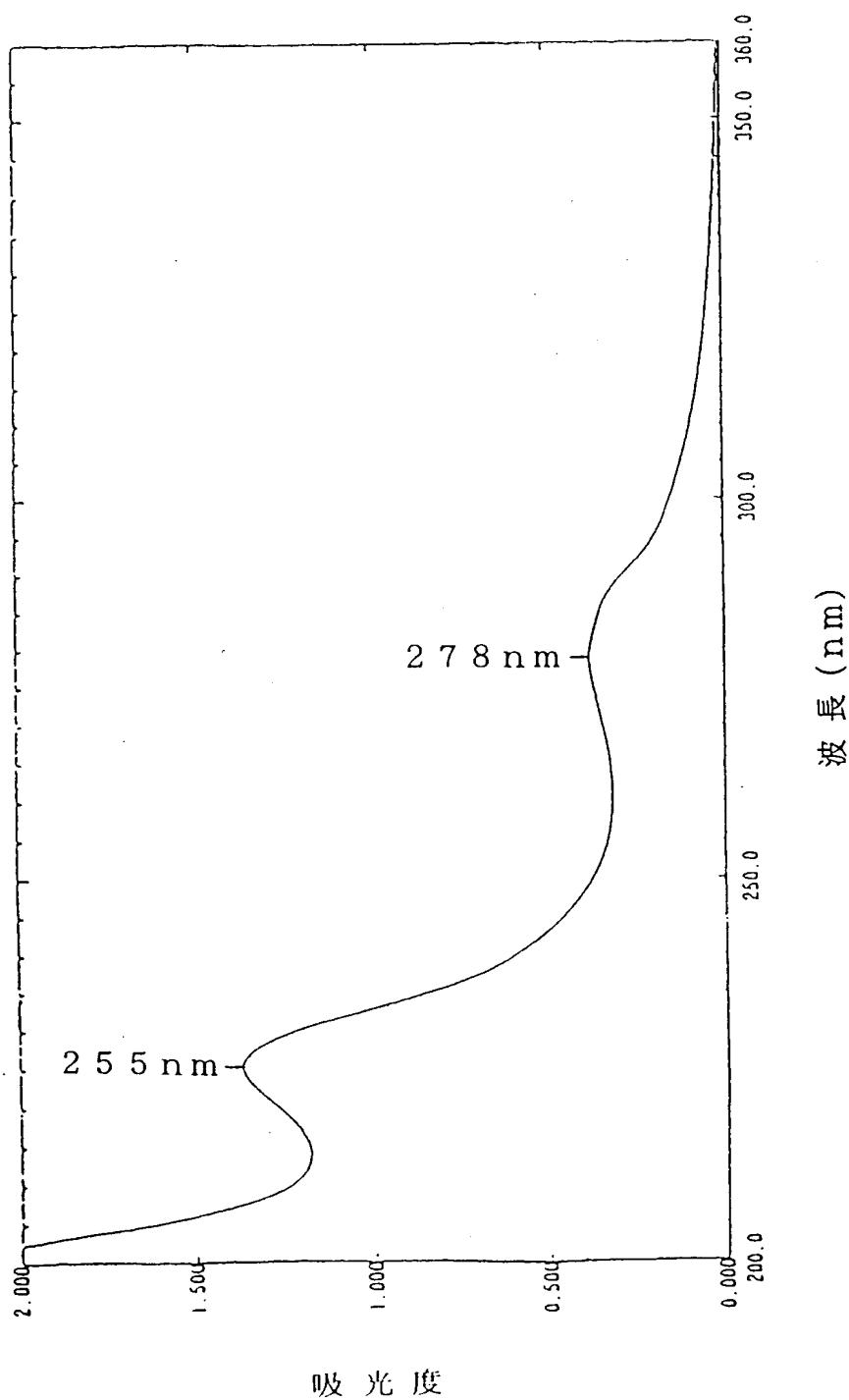


図 3 0

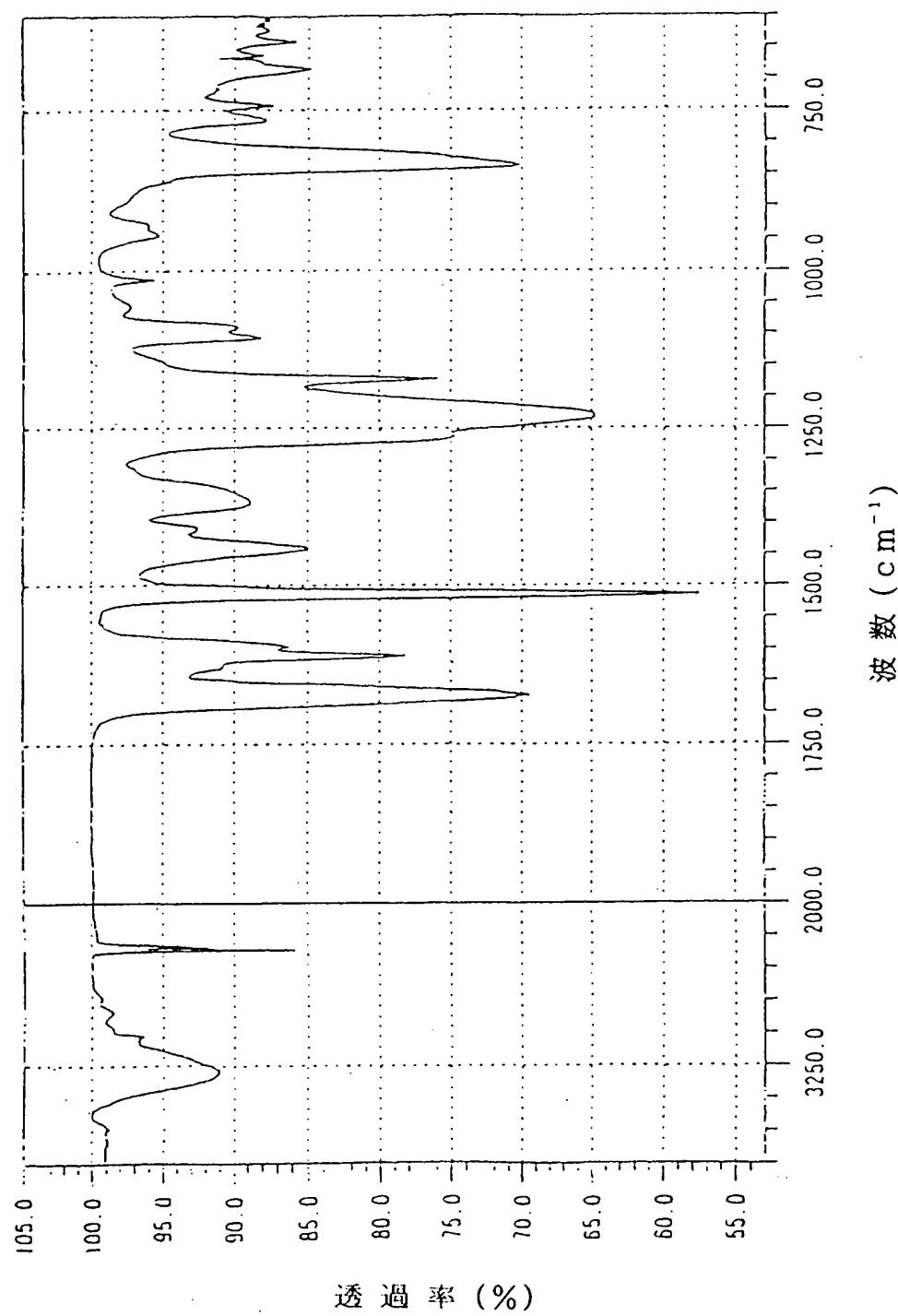


図 3 1

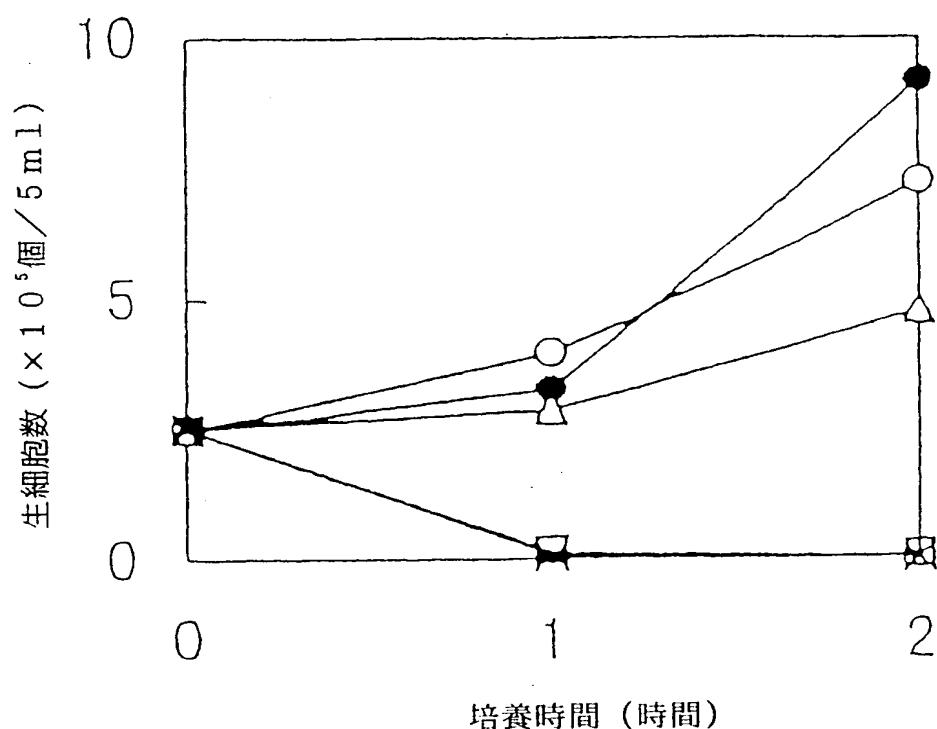


図 3 2

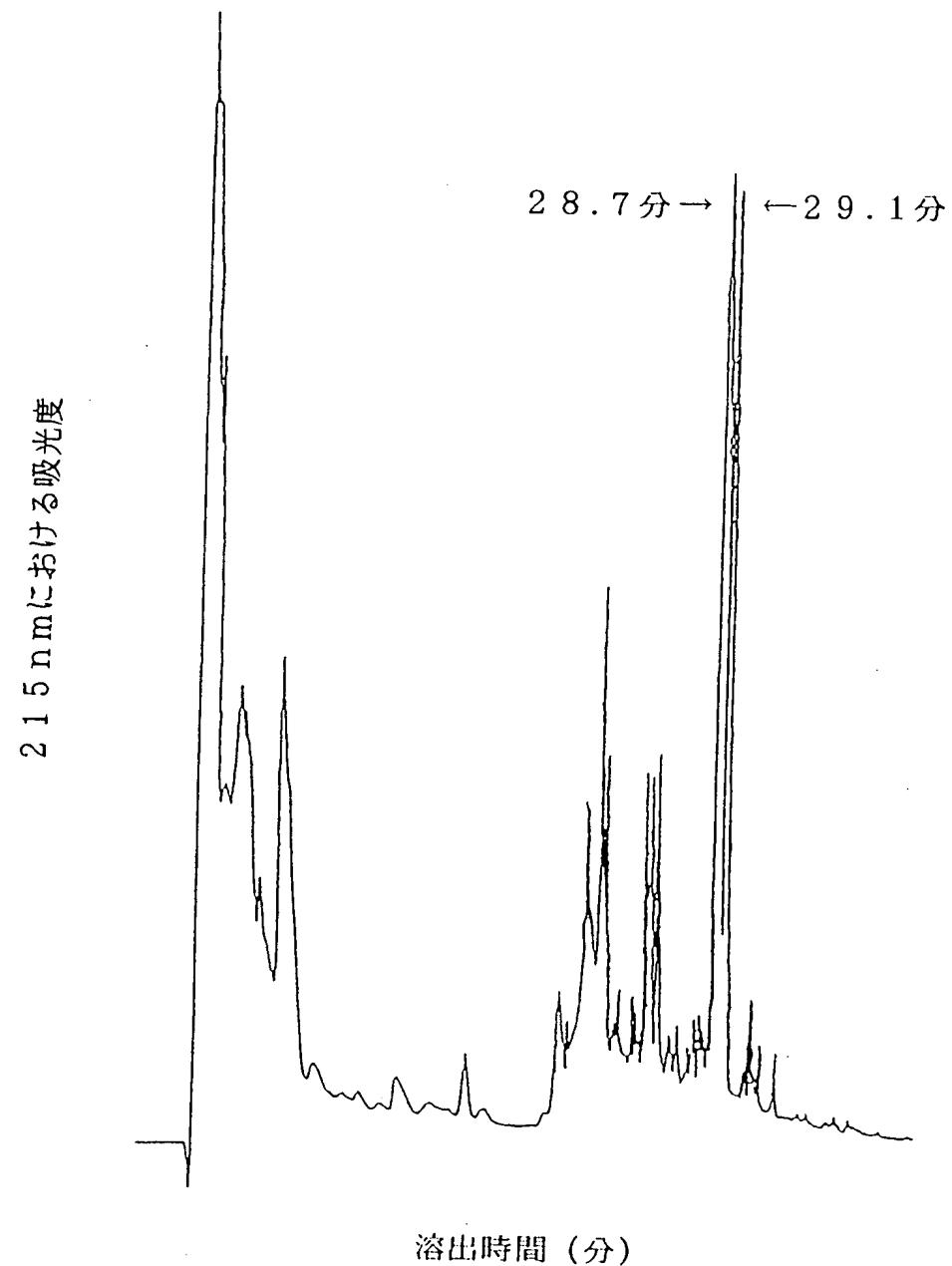
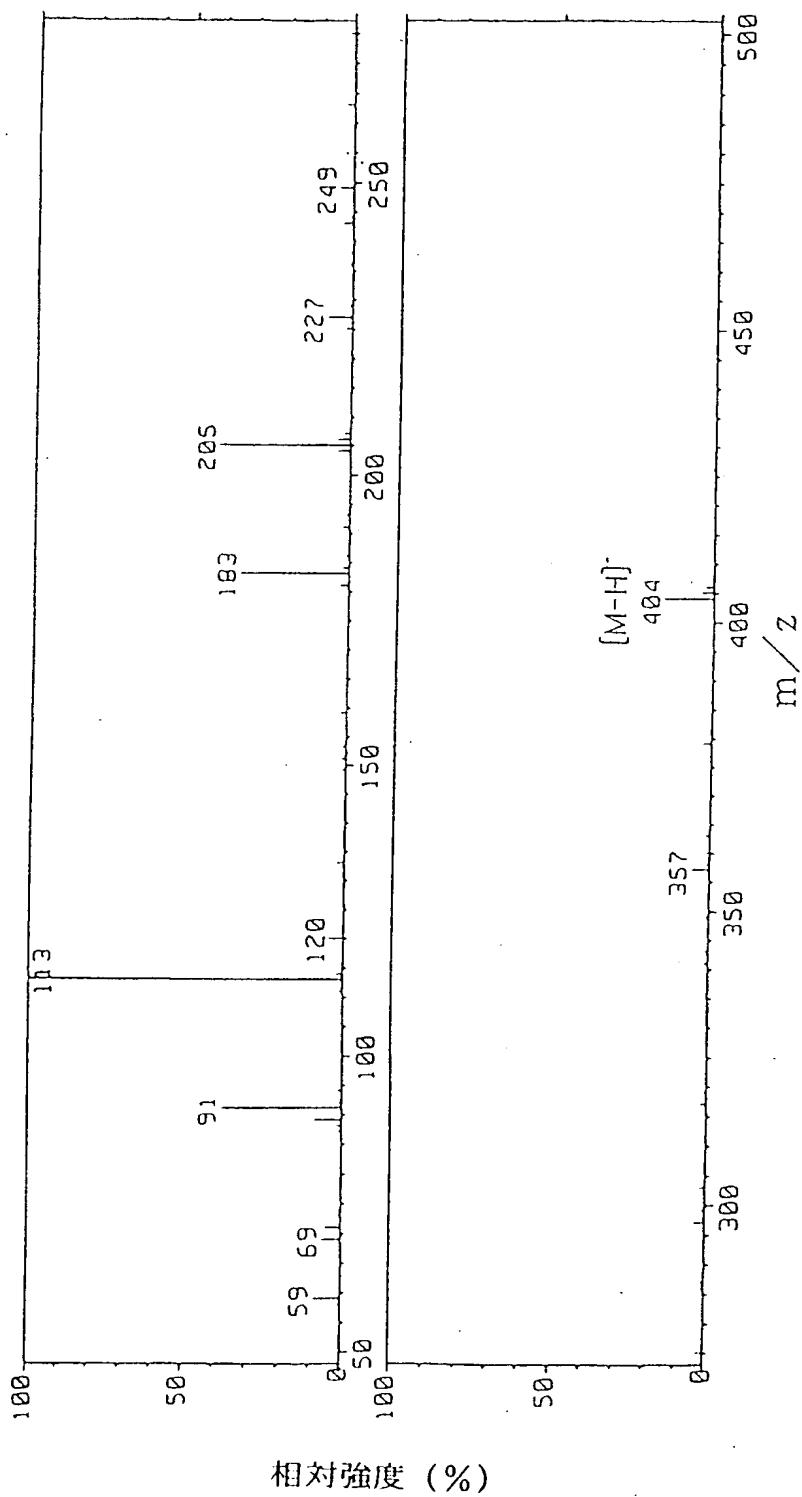
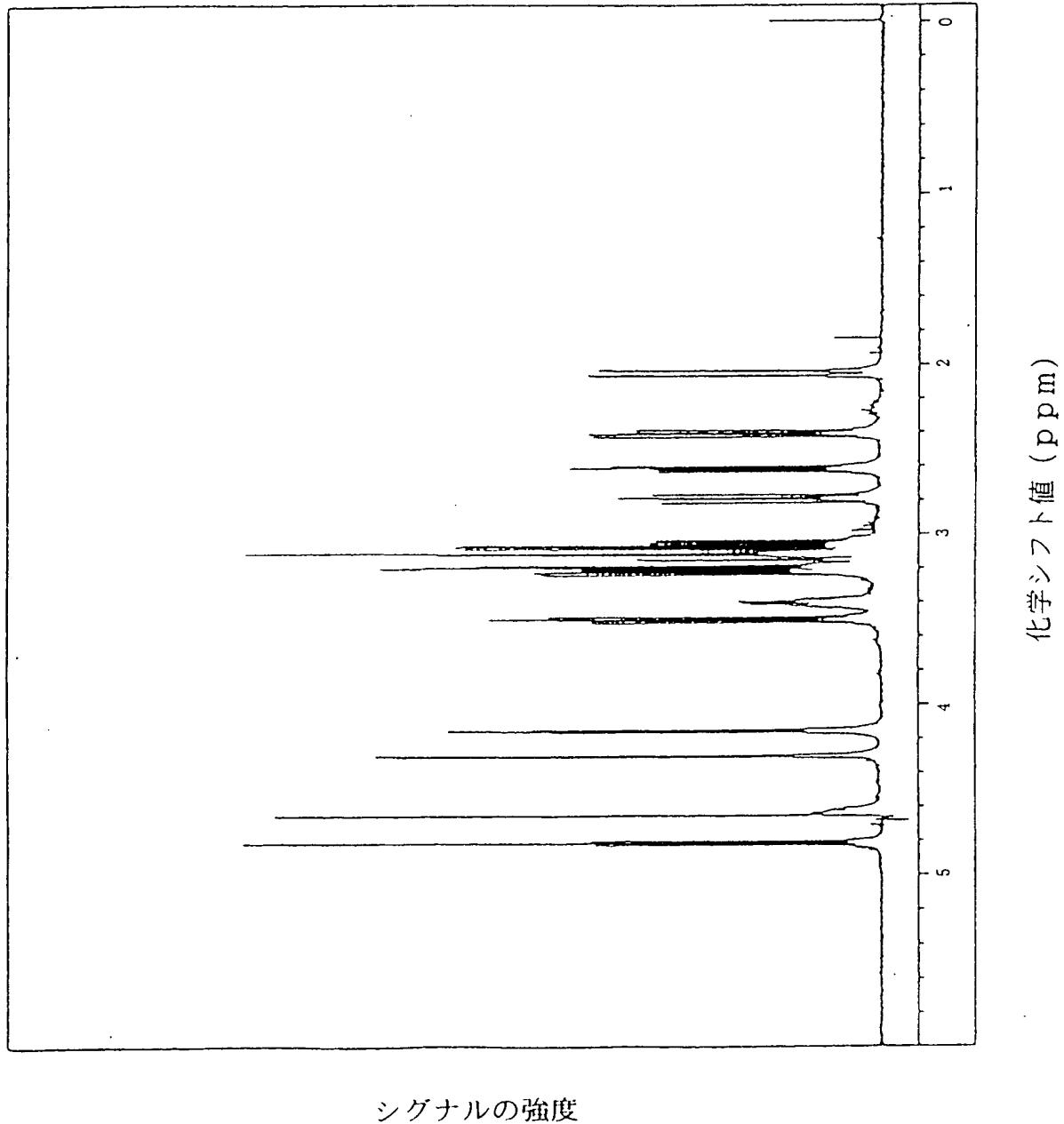


図 3 3



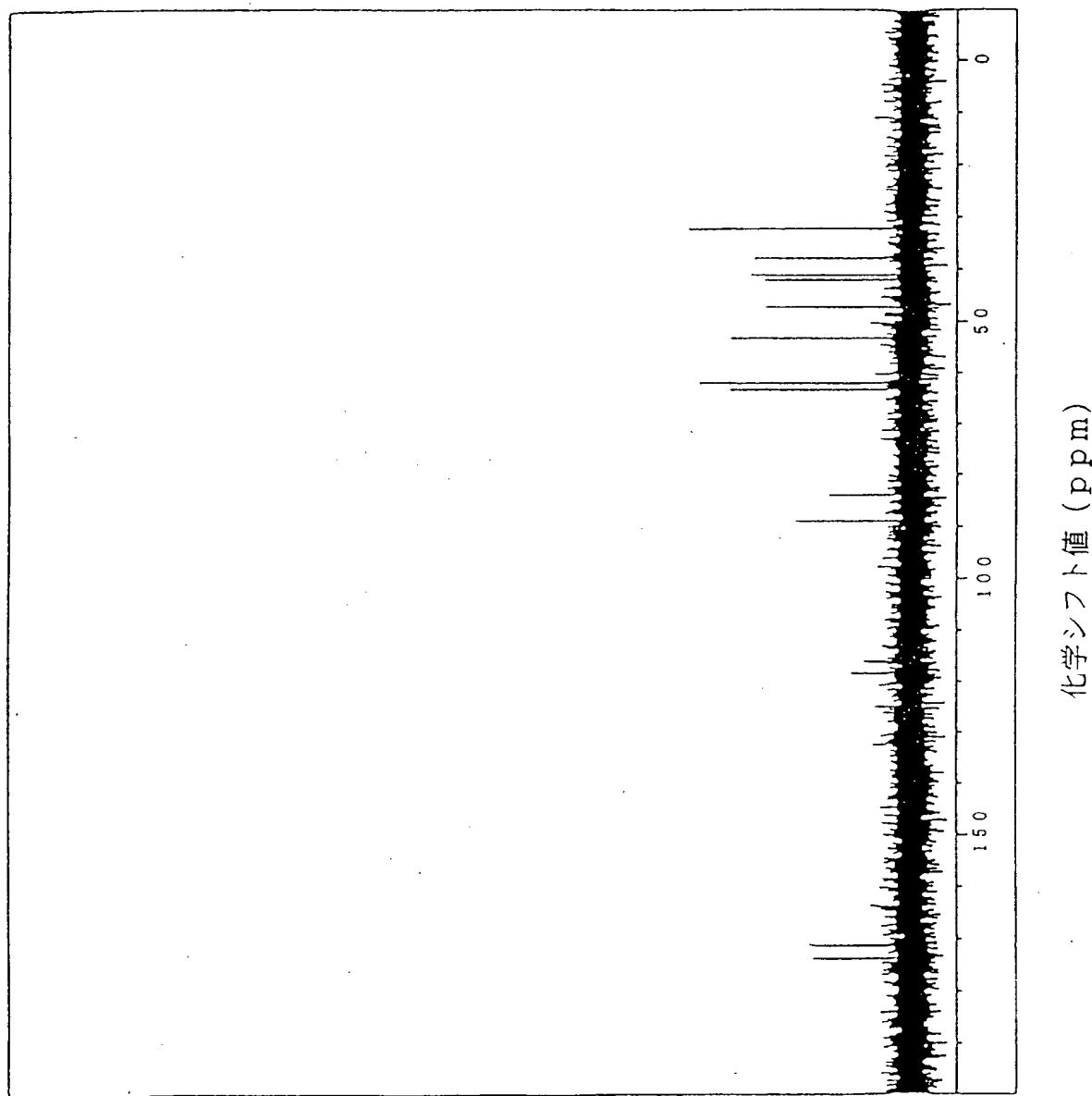
相対強度 (%)

図 3 4



シグナルの強度

図 3 5



シグナルの強度

図 3 6

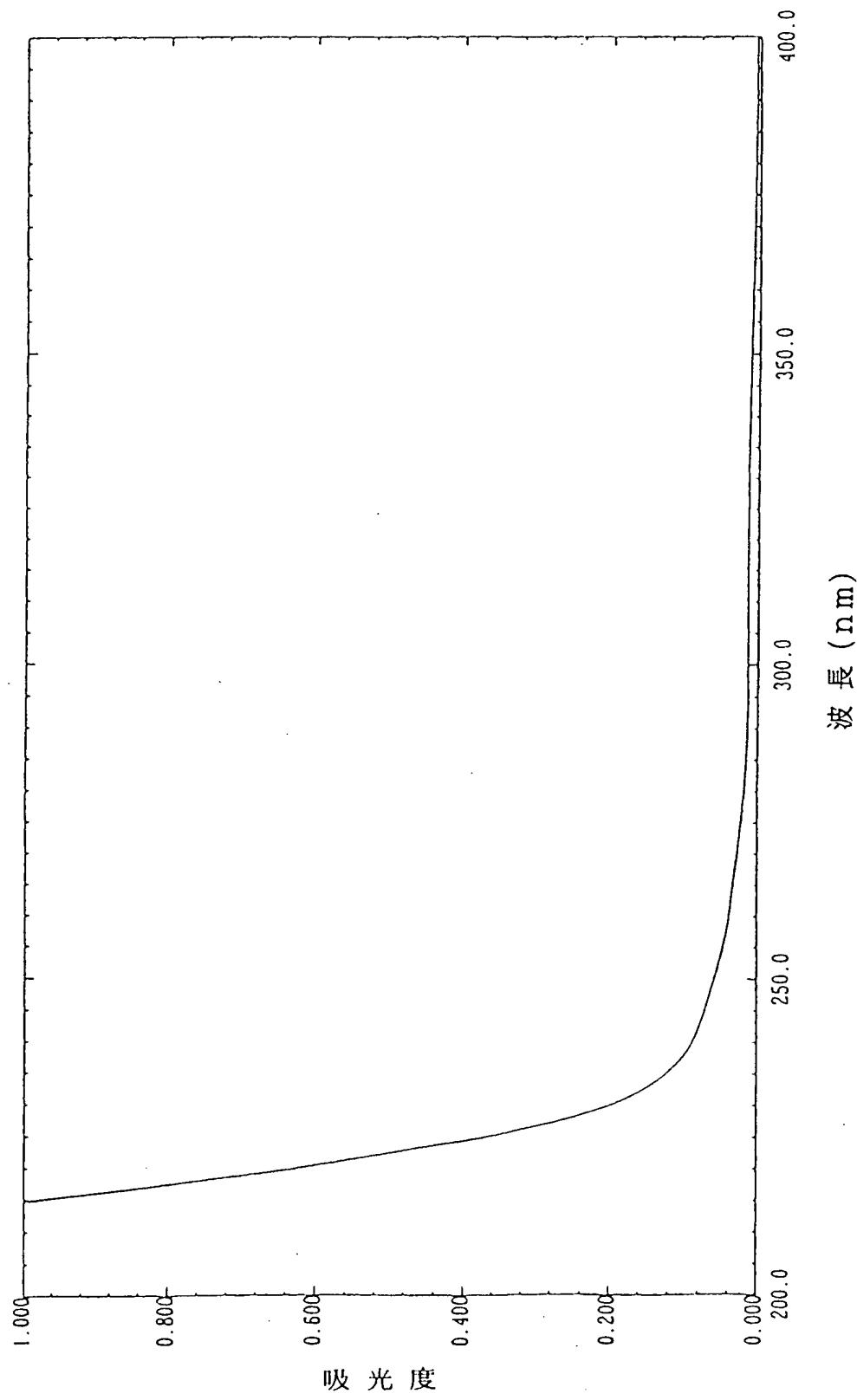


図 37

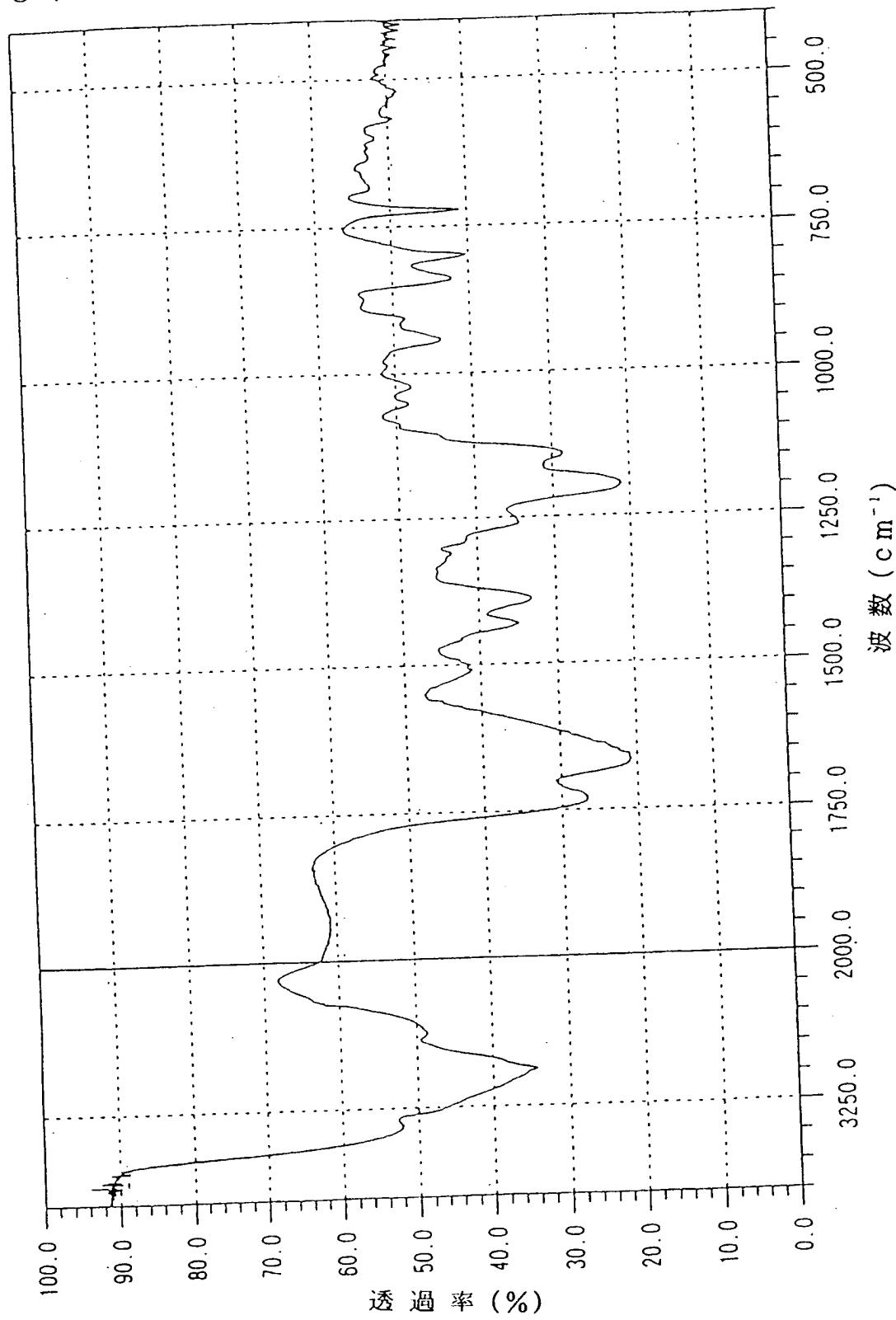


図 3 8

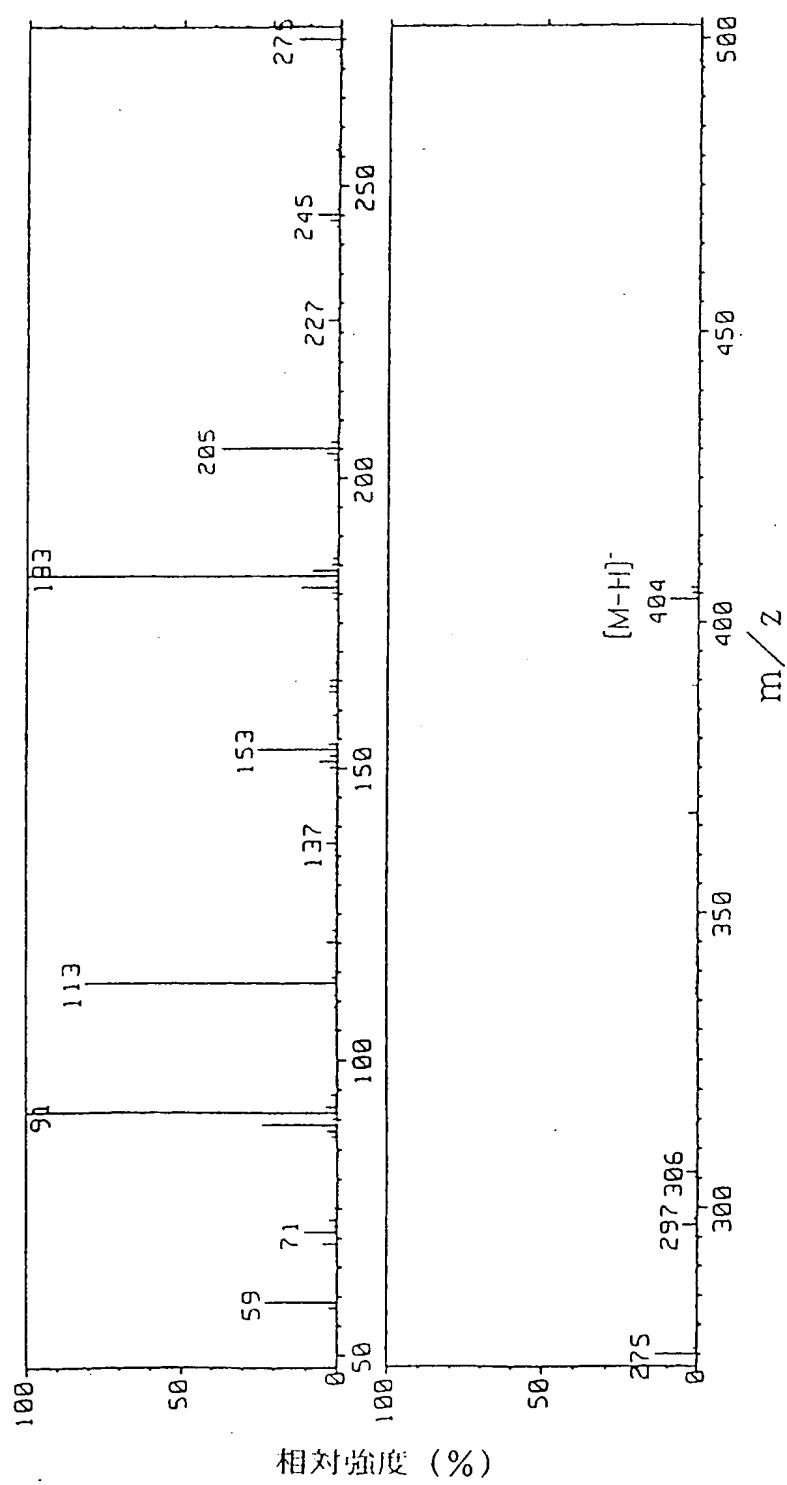
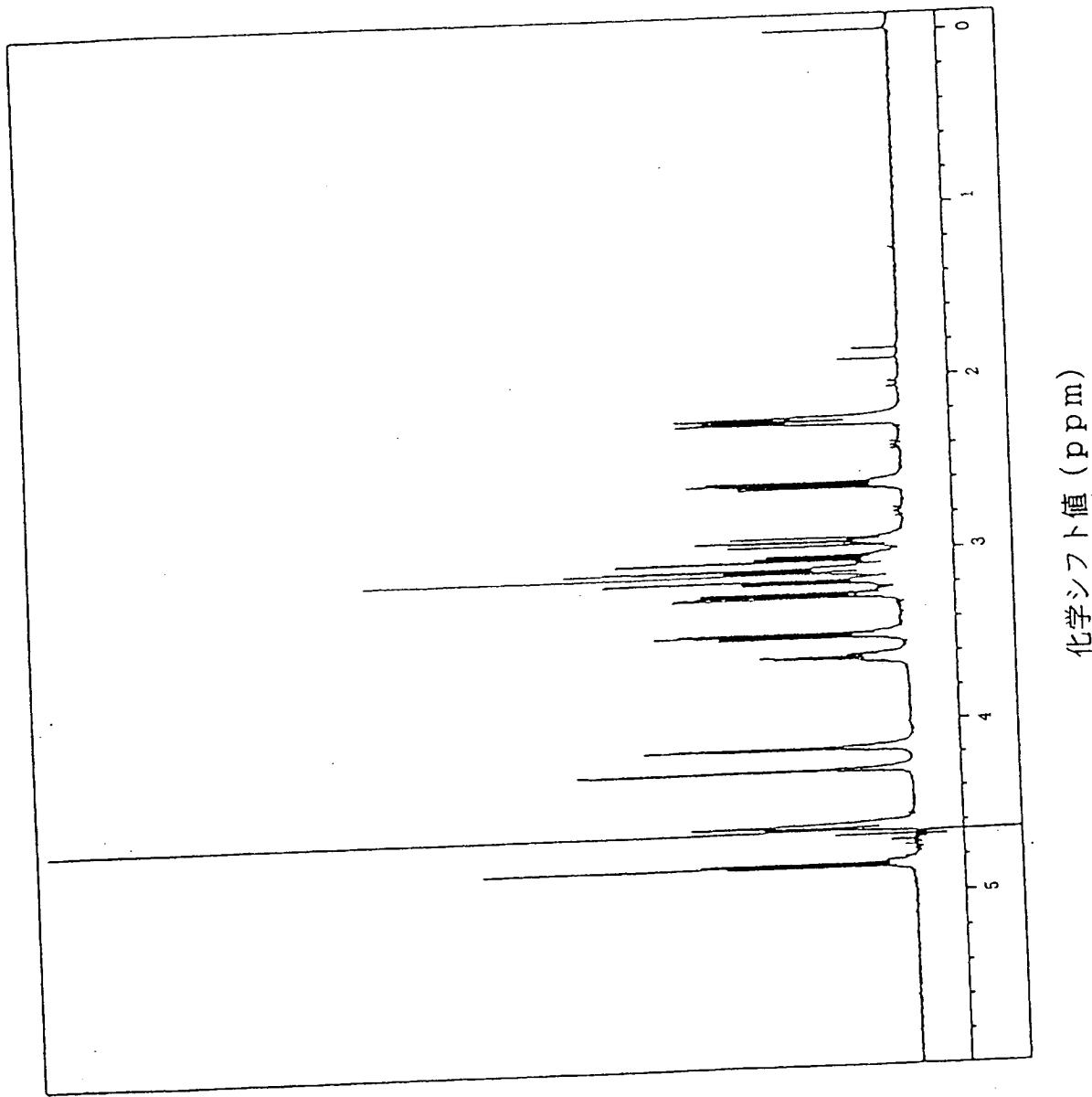


図 3 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05554

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07C49/707, C07C49/753, C07C229/08, C07C233/25, C07D213/65,
C07D233/60, C07D513/18, A61K31/12, A61K31/165, A61K31/415,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07C49/707, C07C49/753, C07C229/08, C07C233/25, C07D213/65,
C07D233/60, C07D513/18, A61K31/12, A61K31/165, A61K31/415,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARNAU, N.; CORTES, J.; MORENO-MANAS, M.; PLEIXATS, R.; VILLA RROYA, M., "Palladium(0)-catalyzed allylation of heterocycles with cyclopentene derivatives", J. Heterocycl. Chem. (1997), 34(1), p.233-239	1
A	SAVILLE-STONES, Elizabeth A.; LINDELL, Stephen D.; JENNINGS, Neil S.; HEAD, John C.; FORD, Mark J., "Synthesis of (.+-.)-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy nucleosides via a modified Prins reaction and palladium(0) catalyzed coupling", J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1991), (10), p.2603-2604	1
A	WO, 93/00066, A1 (Oreal S. A.), 7 January, 1993 (07. 01. 93) & EP, 591373, A1 & US, 5443596, A	1
A	JP, 56-102851, A (Konica Corp.), 17 August, 1981 (17. 08. 81) (Family: none)	1

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
19 February, 1999 (19. 02. 99)Date of mailing of the international search report
2 March, 1999 (02. 03. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP98/05554

C.(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, 3381691, A (Reynolds, R. J., Tobacco Co.), 7 May, 1968 (07. 05. 68) & GB, 1156120, A	1
X	SAKAI, Shoji; TAKENAKA, Mitsuaki; NISHIDA, Hitoshi; HASE, Hiroshi; KIMURA, Shuichiro, "Translocation and metabolism of a seed fungicide, pefurazoate, in rice seedlings", Journal of Pesticide Science (1993), 18(3), p.217-223	1
X	NORRIS, Donald J.; STEWART, Ross, "The pyridinium-dihydropyridine system. I. Synthesis of a series of substituted pyridinium ions and their 1,4-dihydroreduction products and a determination of their stabilities in aqueous buffers", Can. J. Chem. (1977), 55(10), p.1687-1695	1
X	GROENNEBERG, Truls; UNDHEIM, Kjell "N-quaternary compounds. XXV. Ionization constants of pyridinium 3-oxides", Acta Chem. Scand. (1972), 26(5), p.1847-1850	1
PA	WO, 98/39291, A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 11 September, 1998 (11. 09. 98) & AU, 98-61175, A1	1-3
PA	WO, 98/40346, A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 17 September, 1998 (17. 09. 98) & AU, 98-61177, A1	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/05554

A. (Continuation) CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/44, A61K31/495

B. (Continuation) FIELDS SEARCHED

A61K31/44, A61K31/495

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/05554

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. C07C49/707, C07C19/753, C07C229/08, C07C233/25, C07D213/65, C07D233/60, C07D513/18, A61K31/12, A61K31/165, A61K31/415, A61K31/44, A61K31/495

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. C07C49/707, C07C49/753, C07C229/08, C07C233/25, C07D213/65, C07D233/60, C07D513/18, A61K31/12, A61K31/165, A61K31/415, A61K31/44, A61K31/495

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), REGISTRY(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ARNAU, N. ; CORTES, J. ; MORENO-MANAS, M. ; PLEIXATS, R. ; VILLA RROYA, M., "Palladium(0)-catalyzed allylation of heterocycles with cyclopentene derivatives", J. Heterocycl. Chem. (1997), 34(1), p. 233-239	1
A	SAVILLE-STONES, Elizabeth A. ; LINDELL, Stephen D. ; JENNINGS, Neil S. ; HEAD, John C. ; FORD, Mark J., "Synthesis of (+--)-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy nucleosides via a modified Prins reaction and palladium(0) catalyzed coupling", J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1991), (10), p. 2603-2604	1

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 02. 99

国際調査報告の発送日

02.03.99

国際調査機関の名称及び先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

本堂 裕司

印 4H 9049

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

C(続き) 関連すると認められる文献	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	WO, 93/00066, A1 (Oreal S. A.) 7.1月. 1993 (07. 01. 93) &EP, 591373, A1 &US, 5443596, A	1
A	JP, 56-102851, A (小西六写真工業株式会社) 17.8月. 1981 (17. 08. 81) (ファミリーなし)	1
A	US, 3381691, A (Reynolds, R. J., Tobacco Co.) 7.5月. 1968 (07. 05. 68) &GB, 1156120, A	1
X	SAKAI, Shoji; TAKENAKA, Mitsuaki; NISHIDA, Hitoshi; HASE, Hiroshi; KIMURA, Shuichiro, "Translocation and metabolism of a seed fungicide, pefurazone, in rice seedlings", 日本農薬学会誌 (1993), 18(3), p. 217-223	1
X	NORRIS, Donald J.; STEWART, Ross, "The pyridinium-dihydropyridine system. I. Synthesis of a series of substituted pyridinium ions and their 1,4-dihydro reduction products and a determination of their stabilities in aqueous buffers", Can. J. Chem. (1977), 55(10), p. 1687-1695	1
X	GROENNEBERG, Truls; UNDHEIM, Kjell "N-quaternary compounds. XXV. Ionization constants of pyridinium 3-oxides", Acta Chem. Scand. (1972), 26(5), p. 1847-1850	1
PA	WO, 98/39291, A1 (寶酒造株式会社) 11.9月. 1998 (11. 09. 98) &AU, 98-61175, A1	1 ~ 3
PA	WO, 98/40346, A1 (寶酒造株式会社) 17.9月. 1998 (17. 09. 98) &AU, 98-61177, A1	1 ~ 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)